

UCH-FC  
MAG-B  
B 269  
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE



**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**“Evaluación de la tolerancia a estrés abiótico en plantas de tabaco que expresan genes de síntesis de carotenoides.”**

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

**Magíster en Ciencias Biológicas**

Por

**Hita Maciel Barraza Venegas**

**Directora de Tesis: Dra. Claudia Stange K.**

**Co-Director de Tesis: Dra. Liliana Cardemil**

**Septiembre, 2015**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE MAGÍSTER**

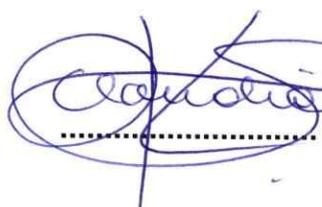
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato:

**HITA MACIEL BARRAZA VENEGAS**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 25 de Septiembre de 2015.

**Director de Tesis**

Dra. Claudia Stange



**Co-Director de Tesis**

Dra. Liliana Cardemil

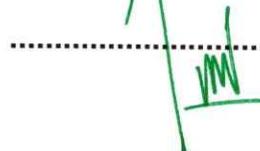


**Comisión de Evaluación de Tesis**

Dra. Lorena Norambuena



Dr. Claudio Pastenes



**“Esta tesis fue financiada por el programa de Formación de Capital Humano Avanzado de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) del Gobierno de Chile mediante la beca de Magíster Nacional 2012**

*A mis padres, por todo el amor incondicional que me entregan a diario. A Javier por su incondicional cariño y apoyo y a todos quienes me entregaron parte de su vida durante este proceso.*



Nací un 15 de diciembre de 1987, en Tumbes. Viví durante toda mi vida en Concepción, junto a mis padres, quienes son lo más importante en mi vida. Desde niña mostraba interés por lo artístico, motivo por el cual me incliné por el teatro y la música, como también las letras. A los 9 años vi en la librería Colón, de la calle Barros Arana, un microscopio y le escribí al viejito pascuero una carta, diciéndole que soñaba con tenerlo para poder investigar “los bichitos” y mi sangre y así fue como todo comenzó.

Ingresé a la Universidad de Concepción, en donde realicé mis estudios de pregrado y viví la universidad en todo sentido. Llegué el año 2012 A Santiago y tuve un aterrizaje forzoso en esta ciudad. Afortunadamente, conocí a la Dra. Claudia Stange y al grupo CSK, quienes me acogieron y enseñaron mucho, contribuyendo en mi crecimiento como profesional y como persona. Me llevo hermosos recuerdos de mi paso por la Universidad de Chile, confiada en las herramientas que me ha entregado para emprender con confianza los proyectos futuros en mi vida profesional.

## Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis compañeros de grupo de laboratorio CSK y a la Dra. Claudia Stange por apoyarme siempre, en todas las circunstancias. Gracias a mis amigos del Centro de Biología Molecular Vegetal, por entregarme tantos buenos momentos, por ayudarme a crecer como profesional, respondiendo a cada duda que tuve durante el desarrollo de mi tesis, discutiendo resultados y compartiendo opiniones.

Gracias a los profesores del CBMV, Dra. Liliana Cardemil, Dr. Michael Handford y Dra. Lorena Norambuena, por los valores científicos entregados y por contribuir en mi formación. Mis agradecimientos especiales a la profe Lore que fue parte fundamental de mi proceso final durante este magíster.

En fin, infinitas gracias a todos quienes compartieron conmigo este período. Sin ustedes, seguro no hubiese sido tan provechoso y bonito. Ange, Seba, compañeros de los distintos grupos de investigación del laboratorio, a ustedes mis más sinceros deseos de éxito y, sobretodo, felicidad.

A mis amigas Panchi, Dani, Romi y Marlen, gracias por su amistad, risas, ayuda, abrazos y contención en momentos difíciles. A mis amigos Ariel, LuisFe, Aliosha gracias por todos los buenos momentos entregados.

A mis hermanas de la tuna, donde encontré mi familia santiaguina. Sin duda, ustedes fueron parte fundamental de mi desempeño como estudiante, entregándome esa fuerza y apoyo cuando la pena parecía ser mayor que la felicidad.

Gracias a Javier por estar conmigo siempre. Comenzamos juntos esta etapa y la terminamos juntos. Gracias por contenerme y ser parte de mi familia durante estos años y , a su vez, gracias Maite, mi dulcito peludo de amor a quien amo con todo mi corazón y quien siempre estuvo ahí, ronroneando, peleando conmigo, sacándome risas a carcajadas y acompañándome durante toda la escritura de tesis, fielmente, sentada a mi lado.

Por último, quiero agradecer a quienes son las personas más importantes de mi vida. Papá, mamá, todos mis esfuerzos y logros los debo a ustedes y sé que lo único que esperan de mi es que me sienta feliz y plena con lo que hago. Mi más sincera admiración y agradecimiento a ustedes, por sobretodo y a Dios, que nos une en el amor. Los amo infinitamente.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
LISTAS DE ABREVIATURAS .....	xi
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Estructura y función de los carotenoides .....	1
1.2 La ruta carotenogénica en plantas.....	3
1.3 Fitoeno sintasa y Licopeno $\beta$ -ciclasa: las enzimas clave de la ruta carotenogénica .....	5
1.4 La ruta carotenogénica y su respuesta a estímulos exógenos: la función de Psy y Lcyb.....	8
1.5 <i>Daucus carota</i> como modelo de estudio.....	11
1.6 Hipótesis.....	15
1.7 Objetivo general .....	15
1.8 Objetivos específicos.....	15
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
2.1 Reactivos de Biología Molecular.....	17
2.2 Material vegetal y condiciones de cultivo .....	17
2.3 Métodos de Biología Molecular.....	19
2.3.1 Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos.....	19
2.3.1.1 Extracción de ARN de plantas.....	19
2.3.1.2 Extracción de ADN genómico de plantas.....	20
2.3.2 Electroforesis en geles de agarosa .....	21
2.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa, PCR.....	21
2.3.3.1 RT PCR.....	21
2.3.3.2 PCR convencional.....	22
2.3.3.3 PCR cuantitativo en Tiempo Real.....	23
2.4 Determinación de la cantidad y composición de carotenoides.....	27
2.4.1 Extracción de carotenoides desde plantas de <i>Nicotina tabacum</i> .....	27
2.4.2 Cuantificación de pigmentos totales mediante espectrofotometría.....	27
2.4.3 Determinación de la composición de carotenoides mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	28
2.5 Medición de la actividad del PSII .....	29

2.6	Ensayo de peroxidación lipídica.....	30
2.7	Ensayo de Fuga Electrolítica.....	30
2.8	Evaluación de la tolerancia a estrés salino crónico de plantas transformadas con el gen <i>DcPsy1</i> y <i>DcLcyb1</i> .....	32
2.9	Análisis estadísticos.....	32
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
3.1	Expresión relativa de los genes <i>DcPsy1</i> y <i>DcLcyb1</i> y contenido de carotenoides y clorofilas en las líneas $T_1$ de <i>N. tabacum</i> transgénicas.....	33
3.1.1	Evaluación de la expresión de los genes <i>DcPsy1</i> y <i>DcLcyb1</i> en las líneas transgénicas de <i>N. tabacum</i> .....	33
3.1.1.1	Evaluación de la expresión del gen <i>Psy1</i> de <i>D. carota</i> en las líneas de tabaco pGWB2/ <i>DcPsy1</i> .....	34
3.1.1.2	Evaluación de la expresión del gen <i>Lcyb1</i> de <i>D. carota</i> en las líneas de tabaco pGWB2/ <i>DcLcyb1</i> .....	35
3.1.2	Determinación del contenido de carotenoides y clorofilas en las líneas pGWB2/ <i>DcPsy1</i> y pGWB2/ <i>DcLcyb1</i> de <i>N. tabacum</i> .....	36
3.1.2.1	Determinación del contenido de carotenoides y clorofilas en las líneas pGWB2/ <i>DcPsy1</i> 37	
3.1.2.2	Determinación del contenido de carotenoides y clorofilas en las líneas pGWB2/ <i>DcLcyb1</i> .....	38
3.2	Evaluación de la expresión de genes endógenos involucrados en la síntesis de carotenoides y clorofilas.....	40
3.2.1	Evaluación de la expresión relativa de genes endógenos involucrados en la síntesis de carotenoides y clorofilas en plantas pGWB2/ <i>DcPsy1</i> de <i>N. tabacum</i> .....	41
3.2.2	Evaluación de la expresión relativa de genes endógenos involucrados en la síntesis de carotenoides y clorofilas en plantas pGWB2/ <i>DcLcyb1</i> de <i>N. tabacum</i> .....	42
3.3	Medición de la actividad del fotosistema II en plantas pGWB2/ <i>DcPsy1</i> y <i>DcLcyb1</i> bajo alta intensidad lumínica.....	43
3.4	Evaluación de la tolerancia a estrés salino en las líneas pGWB2/ <i>DcPsy1</i> y pGWB2/ <i>DcLcyb1</i> de tabaco 45	
3.4.1	Ensayo de peroxidación lipídica en plantas pGWB2/ <i>DcPsy1</i> y pGWB2/ <i>DcLcyb1</i> bajo estrés salino 46	
3.4.2	Ensayo de fuga electrolítica en plantas pGWB2/ <i>DcPsy1</i> y <i>DcLcyb1</i> bajo estrés salino agudo 48	
3.4.3	Evaluación de la tolerancia a estrés salino crónico de plantas transformadas con el gen <i>DcPsy1</i> y <i>DcLcyb1</i> .....	50
3.4.3.1	Tolerancia a estrés salino crónico de plantas transformadas con el gen <i>DcPsy1</i> .....	51
3.4.3.2	Tolerancia a estrés salino crónico de plantas transformadas con el gen <i>DcLcyb1</i> .....	52
<b>4</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>54</b>

4.1	<i>Determinación de la expresión de los genes DcPsy1 y DcLcyb1 en plantas transgénicas de N. tabacum y su participación en la síntesis de carotenoides</i> .....	54
4.1.1	Las líneas transgénicas de <i>N. tabacum</i> que expresan el gen <i>DcPsy1</i> presentan una expresión diferencial del transgen, como también una acumulación diferencial de carotenoides.....	54
4.1.2	La expresión del gen <i>DcLcyb1</i> causa un aumento en los niveles de carotenoides en plantas de tabaco.....	56
4.2	<i>Las líneas transgénicas de N. tabacum que expresan el gen DcPsy1 y DcLcyb1 poseen un incremento en el contenido de clorofila</i> .....	58
4.3	<i>Las líneas de tabaco que expresan el gen DcPsy1 y DcLcyb1 presentan un aumento en la eficiencia fotoquímica del PSII</i> .....	59
4.4	<i>Existe una relación entre el contenido de carotenoides y la defensa contra estrés oxidativo en las líneas transgénicas analizadas</i> .....	62
4.5	<i>Las líneas transgénicas muestran una menor fuga electrolítica luego de un tratamiento de estrés salino agudo y menor pérdida de peso fresco luego de un estrés salino crónico</i> .....	64
5	<b>CONCLUSIONES</b> .....	70
6	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	72
7	<b>ANEXO</b> .....	84

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Partidores utilizados en esta tesis.....	25
<b>Tabla 2</b> Programas de PCR utilizados en esta tesis .....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Niveles de expresión de <i>DcPsy1</i> en las líneas transgénicas de tabaco.....	35
<b>Figura 2.</b> Niveles de expresión de <i>DcLcyb1</i> en las líneas transgénicas de tabaco.....	36
<b>Figura 3.</b> Concentración de pigmentos en las líneas transgénicas <i>DcPsy1</i> de <i>N. tabacum</i> .....	38
<b>Figura 4.</b> Concentración de pigmentos en las líneas transgénicas <i>DcLcyb1</i> de <i>N. tabacum</i> .....	39
<b>Figura 5.</b> Niveles de expresión de genes endógenos de síntesis de carotenoides y clorofilas en las líneas transgénicas <i>DcPsy1</i> de tabaco.....	42
<b>Figura 6.</b> Niveles de expresión de genes endógenos de interés en las líneas transgénicas <i>DcLcyb1</i> de tabaco.....	43
<b>Figura 7.</b> Medición de la eficiencia fotoquímica en líneas transgénicas.....	45
<b>Figura 8.</b> Medición del contenido de MDA en líneas transgénicas.....	47
<b>Figura 9.</b> Pérdida de electrolitos en líneas transgénicas.....	49
<b>Figura 10.</b> Determinación del peso fresco de plántulas transgénicas sujetas a tratamiento con NaCl <i>in vitro</i> .....	52
<b>Figura 11.</b> Determinación del peso fresco de plántulas transgénicas sujetas a tratamiento con NaCl <i>in vitro</i> .....	53
<b>Figura Anexa 12</b> Determinación del peso fresco de plántulas transgénicas cultivadas <i>in vitro</i> .....	84
<b>Figura Anexa 13</b> Determinación del peso fresco de plántulas transgénicas cultivadas <i>in vitro</i> .....	84

## LISTAS DE ABREVIATURAS

- PS II : Fotosistema II
- wt : planta silvestre *wild type*
- ABA : Ácido Abscísico
- MS : Murashige & Skoog
- cDNA : Ácido desoxirribonucleico copia
- kan : Kanamicina, antibiótico de selección
- EROS : Especies Reactivas de Oxígeno
- DNA : Ácido desoxirribonucleico
- PCR : Reacción en cadena de la Polimerasa
- ARN : Ácido ribonucleico
- ARNm : Ácido ribonucleico mensajero
- RT : Transcripción Reversa o transcriptasa reversa
- $\mu\text{L}$  : microlitro
- MDA : malondialdehido
- NaCl : Cloruro de Sodio

## RESUMEN

Los carotenoides son compuestos isoprenoides sintetizados por todos los organismos fotosintéticos y por algunas bacterias y hongos no fotosintéticos. En plantas, se localizan en plastidios, participando en la captación de luz durante la fotosíntesis y también en la prevención del daño oxidativo generado bajo condiciones de estrés ambiental. Son precursores de importantes hormonas vegetales, como el ácido abscísico (ABA) y estrigolactonas. El gen *Psy*, responsable de la síntesis de la enzima fitoeno sintasa (PSY), que cataliza la primera reacción propia de la ruta carotenogénica, ha sido reportado como el gen clave en la regulación de la biosíntesis de carotenoides en diversos modelos vegetales. Otro de los puntos clave en la ruta de síntesis de carotenoides es la síntesis de  $\beta$ -caroteno a partir de licopeno, reacción catalizada por la enzima licopeno  $\beta$ -ciclase (LCYB). 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, respectivamente, durante el desarrollo, mientras que *Lcyb* posee dos genes parálogos (*Lcyb1* y *Lcyb2*) de los cuales *Lcyb1* participa en la síntesis de carotenoides en todos los tejidos de la planta, a pesar de su expresión preferencial en hojas. Con el propósito de dilucidar el rol de los carotenoides en conferir tolerancia a condiciones de estrés salino y lumínico, desarrollamos el presente trabajo enfocado en analizar la participación de los genes *DcPsy1* y *DcLcyb1* en la síntesis de carotenoides, clorofilas y en la tolerancia a condiciones de estrés. La expresión heteróloga del gen *Psy1* de *D. carota* (*DcPsy1*) en *N. tabacum*, provoca un aumento de carotenoides y clorofilas, sin embargo este aumento no se condice con los niveles de expresión relativos del gen como tampoco es homogéneo en todas las líneas analizadas. En contraste, la expresión heteróloga del gen *Lcyb1* de *D. carota* (*DcLcyb1*) en *N. tabacum*, genera un aumento en el

contenido de carotenoides totales y específicos, como también clorofilas en todas las líneas analizadas, los cuales se condicen con los niveles de expresión del transgen y de genes endógenos clave en la ruta de síntesis de carotenoides y clorofilas. La evaluación de la participación de estos genes en conferir tolerancia a estrés salino y alta intensidad lumínica, parámetros que fueron medidos evaluando la eficiencia del PSII y tolerancia a tratamientos de estrés salino agudo y crónico, indica que no se observa una tendencia clara en el desarrollo de una tolerancia a estrés salino en las plantas transgénicas *DcPsy1*, mientras que el gen *DcLcyb1* muestra una respuesta positiva frente a los estímulos de estrés, confiriendo tolerancia en todas las líneas analizadas. Considerando los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos que la expresión de los genes *DcPsy1* y *DcLcyb1* tiene distintos efectos en la conferencia de una tolerancia al estrés, dada por el efecto diferencial en la modulación de la ruta de síntesis de carotenoides y clorofilas, generado por estos genes, en las plantas de tabaco transgénicas.

## ABSTRACT

Carotenoids are isoprenoids compounds which are synthesized in photosynthetic organism and in some bacterias, fungi and algae. In plants, they are localized in plastids, and participates in light harvesting during photosynthesis and in the prevention of oxidative damage under abiotic stress conditions. They are precursors for abscisic acid (ABA) and strigolactones. In animals, carotenoids act as a source of vitamin A and as antioxidant molecules.

The phytoene synthase (PSY) enzyme, which catalyze the first committed step in the pathway, has been reported as a key regulatory point in the pathway in many plant models. Another key point is the synthesis of  $\beta$ -carotene from lycopene, a reaction catalyzed by the enzyme lycopene  $\beta$ -cyclase (LCYB). In *D. carota*, our plant model, two paralog genes for *Psy* (*DcPsy1* y *DcPsy2*) and *Lcyb* (*DcLcyb1* and *DcLcyb2*) have been described. *DcPsy1* y *DcPsy2* present differential expression pattern during leaves and root development, while *DcLcyb1* participates in carotenoid biosynthesis in all tissues of the plant despite its preferential expression in leaves. With the purpose to elucidate the rol of *DcPsy1* and *DcLcyb1* in abiotic stress tolerance, we analyzed in the present work, the carotenoid and chlorophyll composition and abiotic stress tolerance in *Nicotiana tabacum* plants that express *DcPsy1* and *DcLcyb1* genes. *DcPsy1* heterologous gene expression in tobacco causes an increase in carotenoids and chlorophylls, however, it is not consistent with the relative expression levels of the transgene. In contrast, *DcLcyb1* heterologous gene expression in tobacco causes an increase in the total and specific carotenoid content as well in chlorophylls in all transgenic lines tested, which correlated with *DcLcyb1* gene expression and expression of endogenous key carotenogenic genes. We did not observe a correlation in salt and light stress tolerance

for *DcPsy1* plants evaluated through photochemical efficiency of PSII and salt tolerance under acute and chronic salt stress treatment. On the other hand, *DcLcyb1* plants presented a significant tolerance response under the same stress treatments, in accordance with the amount of carotenoids and *DcLcyb1* expression levels.

All these results suggest that the expression of *DcPsy1* and *DcLcyb1* have differential effects to confer an abiotic stress tolerance, given by the differential accumulation of carotenoides and chlorophylls in tobacco transgenic plants.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Estructura y función de los carotenoides

Los carotenoides son una gran familia de pigmentos isoprenoides de naturaleza lipofílica, sintetizados en plastidios de plantas, algas y cianobacterias. Poseen una estructura química que consiste en ocho unidades isoprenoides unidas extremo con extremo para formar un esqueleto hidrocarbonado de 40 carbonos que incluye un sistema de dobles enlaces conjugados y grupos terminales lineales o cíclicos. Estas características determinan sus propiedades físicas, químicas y biológicas, como la absorción de luz y la generación de color. Existen más de 600 tipos de carotenoides, los cuales pueden ser divididos en dos subgrupos: los carotenos, que poseen sólo átomos de carbono e hidrógeno y las xantófilas, las cuales constituyen los derivados oxigenados de los carotenos (Hirschberg, 2001; Giorio y col., 2007; Walter y Strack, 2011).

En plantas, la síntesis de carotenoides ocurre al interior de los plastidios, tales como cloroplastos y cromoplastos (Cunningham y Gantt, 1998), actuando como estabilizadores de sus membranas, evitando así la oxidación de los lípidos que la componen (Demigg-Adams y col.; 1996). En los cloroplastos, se localizan en las membranas tilacoidales, actuando como pigmentos accesorios durante la fotosíntesis en donde amplían la longitud de onda captada por la clorofila, absorbiendo luz de la región azul y parte de la región verde del espectro visible (450-570 nm), energía que es posteriormente transferida a las clorofilas durante el proceso de la fotosíntesis (Ritz y col., 2000; Koyama y col., 2004; Dall'Osto y col., 2006; Stange y Flores, 2012). Se acumulan específicamente en la grana y en el

centro de reacción del fotosistema II (PS II), donde participan en la cosecha de luz, transfiriendo posteriormente la energía absorbida a las clorofilas durante el proceso de la fotosíntesis y constituyendo parte esencial de la maquinaria fotosintética, ensamblando los fotosistemas. En las plantas, la luz destinada a impulsar el proceso fotosintético es absorbida tanto por clorofilas y carotenoides, siendo ambos los principales pigmentos de la fotosíntesis. Estos se encuentran asociados a los complejos pigmento-proteína en los fotosistemas. A pesar de que la clorofila es la biomolécula cromófora que interviene de manera más directa en la absorción y conversión de la energía luminosa, los carotenoides se encuentran en equilibrio con éstas, ampliando el espectro de absorción, como también protegiendo los fotosistemas del exceso de energía lumínica mediante los mecanismos de disipación de ésta en forma de calor y fluorescencia. (Howitt y Pogson, 2006; Ritz y col., 2000; Koyama y col., 2004; Dall'Osto y col., 2006; Stange y Flores, 2011).

Los carotenoides cumplen una importante función como fotoprotectores, previniendo el daño oxidativo provocado por especies reactivas de oxígeno tales como el singlete de oxígeno, el radical superóxido y el triplete excitado de clorofila, generado en los centros de reacción del PSII por un exceso de incidencia de luz, como también disipando el exceso de ésta, absorbido por los pigmentos de la antena, mediante el ciclo de las xantófilas (Britton, 1995; Demigg Adams y col., 1996; Cunningham y Gantt, 1998; Niyogi, 1999). Son precursores de apocarotenoides como las hormonas vegetales estrigolactonas y ácido abscísico (ABA) (Walton DC y col., 1995; Zeevart y col., 1998), siendo esta última una hormona fundamental para el desarrollo de la planta, ya que participa en procesos vitales de su fisiología, tales como el crecimiento y desarrollo, la dormancia de semillas, apertura y cierre estomático, germinación y la

adaptación a distintos tipos de estrés ambiental, en especial la sequía y elevada salinidad (Rock y Zeevart, 1991; Leung y Giraudat, 1998; Crozier y col., 2000; Milborrow, 2001; Lindgren y col., 2003; Nambara y Mario Poll, 2005; Howitt y Pogson, 2006; Chen y col., 2008).

En raíces, flores y frutos, los carotenoides son sintetizados por plastidios modificados, llamados cromoplastos, siendo muy importantes para atraer polinizadores y agentes de dispersión de semillas (Howitt y Pogson, 2006; Goodwin TW, 2012). En animales, los carotenoides provienen del consumo de alimentos vegetales en la dieta y cumplen funciones de precursores de metabolitos esenciales como la vitamina A (Niyogi, 1999; Yeum y Russel, 2002), como también ejercen un rol antioxidante, previniendo ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades degenerativas (Collins 1999; Hadley y col., 2002; Bone y Landrum 2010)

## **1.2 La ruta carotenogénica en plantas**

Los carotenoides derivan de procesos metabólicos secundarios, los cuales tienen lugar en los plastidios. La biosíntesis de carotenoides comienza con la síntesis del isopentil pirofosfato (IPP) y su isómero, dimetilalil pirofosfato (DMAPP), los cuales provienen de la ruta del 2-C-metil-D-eritritol 4 fosfato (MEP) (Eisenreich y col., 2001; Hunter, 2007, Rodríguez Concepción, 2010). La condensación de tres moléculas de IPP con DMAPP es catalizada por la enzima geranylgeranyl pirofosfato sintasa (GGPPS) y da lugar al geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) (Lichtenthaler, 1999; Bouvier y col., 2005). Dos moléculas de GGPP se unen por sus extremos por acción de la enzima fitoeno sintasa (PSY), dando origen al fitoeno. Esta reacción es considerada el principal paso limitante en la ruta de biosíntesis de carotenoides. El gen *Psy*,

responsable de la síntesis de la enzima PSY que cataliza la primera reacción propia de la ruta carotenogénica, ha sido reportado como el gen clave en la regulación de la biosíntesis en diversos modelos vegetales (Hirschberg, 2001; Fraser y Bramley, 2004; Cazonelli y Pogson 2010).

El fitoeno, de característica incolora, es desaturado e isomerizado para formar licopeno (un carotenoide rojizo), por acción de las enzimas fitoeno desaturasa (PDS),  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZDS), 15-*cis*- $\zeta$ -caroteno isomerasa (ZISO) y la pro-licopeno carotenoide isomerasa (CRTISO). Luego, el licopeno sufre ciclaciones en ambos extremos de su cadena, dando lugar a dos carotenoides de coloración anaranjada:  $\alpha$ -caroteno, el cual presenta un anillo  $\epsilon$  en un extremo y en el otro, un anillo  $\beta$  y cuya síntesis es catalizada por las enzimas licopeno  $\epsilon$  ciclasa (LCYE) y licopeno  $\beta$  ciclasa (LCYB) y  $\beta$  caroteno, con dos anillos  $\beta$ , uno en cada extremo de la molécula, y cuya síntesis es catalizada únicamente por la enzima LCYB. Este paso constituye el primer punto de ramificación en la ruta de biosíntesis de carotenoides. El  $\beta$  caroteno, luego de ser hidroxilado, produce zeaxantina, reacción mediada por la enzima caroteno  $\beta$  hidroxilasa (CHYB). Por otro lado, la hidroxilación del  $\alpha$  caroteno, la cual es mediada por la enzima  $\beta$  y  $\epsilon$  hidroxilasa (CHYB y CHYE), da lugar a la producción de la luteína, una xantofila de coloración amarilla. Adicionalmente, la zeaxantina es epoxidada por la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP), formando violaxantina. Algunos carotenoides pueden derivar en apocarotenoides, dando origen a las hormonas vegetales estrigolactonas y ABA. (Walter y Strack, 2011)

### 1.3 Fitoeno sintasa y Licopeno $\beta$ -ciclase: las enzimas clave de la ruta carotenogénica

El gen *Psy* es considerado un gen clave en la biosíntesis de carotenoides, ya que codifica para la enzima PSY, la cual cataliza el paso limitante más importante dentro de esta ruta, condensando dos moléculas de GGPP para producir 15-*cis* fitoeno (Cunningham y col., 1998; Shewmaker y col., 1999; Bramley 2002; Fraser y Bramley, 2004). Los genes *Psy* aumentan su nivel de transcrito frente a diversos estímulos y condiciones de crecimiento como: fotoperíodo, ABA, etapas del desarrollo de la planta, distintos tipos de estrés abiótico, entre otros factores (Bramley, 2002; Howitt y Pogson, 2006; Tanaka y col., 2008)

En primera instancia, PSY fue purificada desde cromoplastos de *Capsicum annuum* (Dogbo y col., 1988) y luego, por complementación heteróloga en bacterias, se encontró una fitoeno sintasa funcional en frutos de tomate (Bartley y col., 1992) como también un segundo gen *Psy* específico para hojas en esta misma especie (Bartley y Scolnik 1993). En estos estudios se demostró que pueden estar asociadas a la membrana del tilacoide en el cloroplasto o pueden corresponder a proteínas localizadas en el estroma del mismo organelo (Hirschberg, 2001; Fraser y Bramley, 2004).

El gen *Psy* ha sido estudiado en diversas especies vegetales, tales como *Capsicum annuum* (Romer y col., 1993), *Arabidopsis thaliana* (Scolnik y Bartley 1994), *Cucumis melo* (Karvouni y col., 1995), *Zea mays* (Buckner y col., 1996; Aluru y col., 2008), *Brassica napus* (Shewmaker y col., 1999), *Solanum lycopersicum* (Fraser y col., 1994), *Solanum tuberosum* (Diretto y col., 2007) y *Oryza sativa* (Ye y col., 2000; Paine

y col., 2005) entre otras especies. *Arabidopsis thaliana* posee solo un gen *Psy*, mientras que zanahoria, tabaco, maíz y arroz poseen más de una *Psy* (Scolnik y Bartley 1994; Li y col., 2008, Welsch y col., 2008, Clotault y col., 2008, Busch y col., 2002). Los genes *Psy* de estas dos últimas indican que los parálogos del gen muestran una función órgano específica, como también una inducción frente a distintos tipos de estímulos exógenos (Welsch y col., 2008). La abundancia génica se debe a eventos de duplicación y sub funcionalización, los cuales se pueden deber a la evolución de los genes y enzimas PSY desde un prototipo ancestral de este gen.

La importancia del gen *Psy* en el control de la biosíntesis de carotenoides ha sido demostrada al permitir un aumento en la producción de carotenoides en flores y frutos como es el caso del tomate, donde *Psy1* codifica un isoforma cuya funcionalidad es específica en flores y frutos, mientras que *Psy2* es el parálogo, cuya función es predominante en tejidos fotosintéticos (Giuliano y col., 1993) En cítricos se ha observado que los niveles de transcrito de *Psy* se ven correlacionados con un aumento en los niveles de acumulación de carotenoides (Ikoma y col., 2001; Kato y col., 2004). En maíz, *Psy1* y *Psy2* cumplen un rol fundamental en la acumulación de carotenoides en el endosperma y en la fotomorfogénesis en tejidos fotosintéticos, mientras que *Psy3* está asociada con la carotenogénesis en la raíz y es necesaria para la producción de ABA inducida por sequía y salinidad (Li y col., 2008 a y b).

La ciclación del licopeno por las enzimas licopeno ciclasas (LCYE y LCYB) marca un importante punto de ramificación en la ruta metabólica de los carotenoides. Las enzimas tipo licopeno ciclasas presentan alrededor de 400 aminoácidos y un

peso molecular de aproximadamente 40 kDa. LCYE y LCYB muestran una alta homología en su secuencia aminoacídica y es muy probable que hayan evolucionado desde un ancestro común (Krubasik y Sandmann, 2000). Por un lado de la ramificación, cataliza la formación de  $\beta$  caroteno mediante la adhesión de anillos  $\beta$  en ambos extremos de licopeno y también xantofilas, mientras que el otro brazo de su ramificación conlleva a la formación de  $\alpha$  caroteno y luteína. Alteraciones en su regulación o en la actividad enzimática afectan fuertemente la composición de los carotenoides en los distintos tejidos vegetales (Hirchsberg, 2001; Bramley, 2002; Cunningham, 2002; Botella-Pavia & Rodríguez-Concepción, 2006; Howitt y Pogson, 2006) lo cual convierte a *Lcyb* en otro gen clave de esta ruta.

En primera instancia, *Lcyb* fue identificada en *cyanobacterium* (Cunningham y col., 1993) y, desde entonces, ha sido caracterizada en diversas especies de plantas como *Arabidopsis thaliana* (Lange y col., 2003), *Oryza sativa* (Fang y col., 2008) y *Zea mays* (Singh y col., 2003; Bai y col., 2009) en donde LCYB es codificada por un solo gen. En otras especies se han encontrado dos genes codificando para esta enzima, los cuales muestran una expresión diferencial en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos, como es el caso de *Capsicum annuum* (Huguene y col., 1995), *Carica papaya* (Skelton y col., 2006; Devitt y col., 2009; Blas y col., 2010), *Citrus lanatus* (Bang y col., 2007), *Crocus sativus* (Ahrazem y col., 2009) y *Solanum lycopersicum*, en donde *Lcyb* y *Cyc-B* corresponden a las dos copias de este gen, las cuales presentan distintas funcionalidades. *Lcyb* es activa en tejidos fotosintéticos, mientras que *Cyc-B* es requerida en tejidos que presentan cromoplastos (Hirschberg, 2001). Todas las enzimas LCYB identificadas a la fecha en plantas superiores poseen por sobre un 75% de identidad de secuencia aminoacídica y poseen un sitio de unión al

dinucleótido (FAD/NADH) y dos motivos conservados característicos de este tipo de enzimas (Hugueney y col., 1995).

Otros estudios han reportado que al sobre expresar genes *Lcy* de especies como *A. thaliana*, *S. lycopersicum* y *Salicornia europaea*, se han observado resultados positivos en cuanto a la síntesis de carotenoides en plantas transformadas. Por ejemplo, tomates transgénicos en que se aumentó la expresión de *Lcyb* de *A. thaliana* presentaron frutos naranjos con un aumento en los niveles totales de carotenoides. También, al sobre expresar *SlLcyb* en tomate, los frutos presentaron coloración naranja, lo cual indica que existe una conversión del total de licopeno a  $\beta$ -caroteno en estos frutos (Rosati y col., 2000; Dharmapuri y col., 2002; D'Ambrosio y col., 2003).

Tal es la importancia de esta enzima que deleciones en el gen codificante para *LCYB* generan plantas letales en caso de mutantes homocigotas y, para aquellas mutantes heterocigotas, se observó pérdida en el contenido de carotenoides, blanqueamiento de hojas, acumulación de ROS, muerte celular, disminución de ABA y, por consiguiente, menor tolerancia a estrés abiótico (Conti y col., 2004; Dong y col., 2007).

#### **1.4 La ruta carotenogénica y su respuesta a estímulos exógenos: la función de *Psy* y *Lcyb***

Los carotenoides participan de procesos fisiológicos muy importantes, dentro de los cuales, protegen a la planta al disipar térmicamente el exceso nocivo de energía lumínica, juegan un importante rol en la protección foto – oxidativa contra especies

reactivas de oxígeno (EROS) y triplete excitado de clorofila, como también participan en la respuesta a distintos tipos de estrés ambiental, desarrollo de flores y frutos, etc. (Welsch y col., 2000; Bramley 2002; Li y col., 2008 a y b; Rodríguez Villalón y col., 2009 a y b). El estrés abiótico, como la salinidad, sequía y altas o bajas temperaturas, son las principales causas de la pérdida en la productividad y distribución de la mayoría de los cultivos en el mundo (Graiphenberg y col., 2000; Yokoi y col., 2002; Bray y col., 2000; Tuteja y col., 2007). Bajo condiciones de alta salinidad, el exceso de Na<sup>+</sup> produce efectos perjudiciales en la planta, generando estrés osmótico, toxicidad iónica y estrés oxidativo, lo cual causa una reducción en la tasa fotosintética y, por otro lado, genera un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Kumar y col., 2013)

Existen numerosas evidencias que indican que plantas transgénicas, que expresan genes relacionados con el desarrollo de tolerancia, pueden sobrevivir o persistir bajo condiciones de estrés abiótico (Jaglo-Ottosen y col., 1998; Liu y col., 1998; Kasuga y col., 1999; Haake y col., 2002; Kim y col., 2003 a y b; Mukhopadhyay y col., 2004; Yang y col., 2008; Yoshida y col., 2010). Estudios recientes han demostrado que el incremento en el nivel de carotenoides, mediado por la ingeniería metabólica de plantas, aumenta la tolerancia en la respuesta a distintos tipos de estrés abiótico, tales como salinidad, sequía y estrés oxidativo (Chen y col., 2011; Kim y col., 2012), convirtiendo a esta ruta de biosíntesis en una potencial herramienta para mejorar la tolerancia a estrés en plantas de cultivo.

En plantas de *Oryza sativa* se reportó que un aumento en los niveles de transcrito del gen *OsPsy3* durante estrés hídrico se correlacionaba con una disminución en la acumulación de carotenoides y un aumento en los niveles de ABA

(Welsch y col., 2008). Así como se indicó previamente, en arroz y maíz, la expresión de *Psy1* y *Psy2* es inducida por luz en órganos fotosintéticos, mientras que *Psy3* es inducido por estrés hídrico y ABA (Li y col., 2007, 2008; Welsch y col., 2008). Cidade y col., (2012), realizaron estudios en plantas de tabaco las cuales transformaron con una *Psy* fruto-específica (*CpPsy*) de pomelo (*Citrus paradisi* Macf.). En comparación con las plantas silvestres (*wt*), las plantas transformadas mostraron un incremento significativo en el largo de la raíz y biomasa bajo tratamientos de estrés osmótico y salino. La tolerancia al estrés en las plantas transgénicas fue potenciada, lo cual se correlacionó con el incremento de los niveles de ABA endógeno y la expresión de genes de respuesta a estrés. Esto corrobora que PSY es una enzima clave en la regulación de la síntesis de ABA y que la sobre - expresión de otros genes *Psy* en plantas puede proporcionar una función similar a la de *Psy3* descrita en monocotiledóneas, en relación con la síntesis de ABA y tolerancia al estrés. Los resultados del trabajo de Cidade y col., (2012), abren camino para el uso de *CcPsy*, como también de otras *Psy*, como genes candidatos para incrementar la tolerancia al estrés por sequía y salinidad en cultivos de interés comercial.

Por otro lado, estudios donde se expresó ectópicamente el gen licopeno  $\beta$  - ciclasa de la especie halófila *Salicornia europaea* (*SeLcy*), en *A. thaliana*, mostraron que las plantas de *Arabidopsis* transgénicas experimentaban un potenciamiento en su tolerancia al estrés oxidativo y salino, lo cual se vio reflejado en el rango de sobrevivencia el cual resultó ser mayor que el control silvestre (*wt*) luego de un tratamiento de NaCl 200 mM. Las mismas plantas mostraron una mejor tasa de crecimiento como también mayor actividad del fotosistema y menor acumulación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). En cuanto a la acumulación de pigmentos, plantas de *A.*

*thaliana* transgénicas, sometidas a un tratamiento de 200mM NaCl, acumularon altos contenidos de carotenoides comparado con el control silvestre, lo cual contribuye a la protección del fotosistema bajo estrés salino y contrarresta el efecto negativo para el crecimiento de la planta que podría ejercer la generación de ROS. Por otro lado, plantas de *Nicotiana bentamiana* fueron transformadas con los genes *SeLcy* y *AtLcy*, observándose que la transformación con los genes *Lcy* incrementó la tolerancia a NaCl en tabaco (Chen y col., 2011).

### 1.5 *Daucus carota* como modelo de estudio

Zanahoria (*Daucus carota*), nuestro modelo de estudio, se caracteriza, principalmente, por acumular grandes cantidades de carotenoides, en especial de  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno, durante el desarrollo en oscuridad de su raíz modificada, otorgándole su coloración característica. Diversas especies deben su coloración a la presencia de carotenoides en sus flores, frutos y semillas (Walter y Strack, 2011; Hirschberg, 2001; Fraser y Bramley, 2004; Tanaka y col., 2008), sin embargo, no es común una alta acumulación de estos pigmentos en la raíz, como es el caso de algunas variedades de *D. carota* (Rodríguez Concepción y Stange, 2013). Sin embargo, la síntesis y acumulación de estos compuestos también se produce en sus hojas, que se encuentran expuestas a la luz, por lo que la expresión de los genes carotenogénicos es activada por luz en las hojas de *D. carota*, tal como ha sido descrito en otros modelos vegetales (Von Lintig y col., 1997; Römer y col., 2005). Actualmente, en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), están anotadas las secuencias de la mayoría de los genes que codificarían para las enzimas de la ruta de

síntesis de los carotenoides en *D. carota*. Estas secuencias muestran una alta homología con la mayoría de los genes involucrados en la ruta de biosíntesis de carotenoides que han sido aislados.

En zanahoria se ha reportado que existen dos genes licopeno  $\beta$  ciclasa (*DcLcyb1* y *DcLcyb2*) Ambos genes pertenecen a la misma familia génica, teniendo *DcLcyb2* un alto porcentaje de identidad aminoacídica con la licopeno  $\beta$  ciclasa de tomate (*SILcyb*) y con la capsantina capsorrubina de pimentón (Just y col., 2007). El gen *Lcyb1* es expresado preferencialmente en hojas y raíz de almacenamiento durante el desarrollo de la zanahoria (Fuentes y col., 2012) como también es el gen con mayor aumento en su expresión durante el desarrollo de *Daucus carota* (Fuentes y col., 2012), comparado con otros genes de la ruta carotenogénica en zanahoria. Este aumento alcanza niveles de 16,2 veces en las hojas y 12,4 veces en la raíz modificada de una planta adulta (12 semanas de cultivo). Esto se correlaciona con el aumento de los carotenoides totales durante el desarrollo de la raíz, y en especial del  $\beta$ -caroteno (Fuentes y col., 2011). Por otra parte, la evaluación de la funcionalidad de este gen mediante silenciamiento génico post transcripcional (Moreno y col., 2013), indicó que las líneas transgénicas que poseían este gen silenciado mostraron una disminución significativa de los niveles de carotenoides totales y  $\beta$ -caroteno tanto en hoja como en la raíz modificada (60% y 40% respectivamente), lo cual es signo de la importancia de este gen para la síntesis de carotenoides en la planta completa de zanahoria. También se evaluó su funcionalidad por medio de experimentos de complementación heteróloga en un sistema bacteriano (Moreno y col., 2013), donde se encontró que el gen *Lcyb1* de *D. carota* puede convertir el licopeno en  $\beta$ -caroteno, siendo más eficiente que *DcLcyb2* el cual también es capaz de realizar esta conversión, pero presenta

acumulación del producto intermediario  $\gamma$ - caroteno lo cual evidencia una mayor eficiencia por parte del gen *Lcyb1* de *D. carota*. Con el fin de evaluar la funcionalidad de este gen *in planta*, se sobreexpresó en *D. carota* y se expresó en un sistema heterólogo (*N. tabacum*) (Moreno 2012; Moreno y col., 2013), obteniéndose un aumento considerable en el contenido de carotenoides totales y específicos, como también una alteración en la expresión de genes endógenos clave de la ruta carotenogénica, correlacionándose con los niveles de carotenoides observados, especialmente  $\beta$ -caroteno (Moreno, 2012; Moreno y col., 2013). Dentro de las líneas de tabaco obtenidas al utilizar el vector pGWB2/*DcLcyb1* se obtuvieron 3 líneas T<sub>0</sub> (L14, L15, L16) que presentaron el mayor aumento de carotenoides totales y específicamente de  $\beta$ -caroteno. Además, mostraron un aumento en tamaño y área foliar, presencia adelantada de estructuras florales y mayor concentración de clorofila, como también mayor nivel de expresión del transgen (28, 43 y 296 veces con respecto a la planta silvestre de tabaco).

Análisis fenotípicos y moleculares de la generación T1 de estas líneas transgénicas indicaron que poseen un incremento significativo del contenido de carotenoides ( $\beta$ -caroteno y luteína), el cual correlaciona con una inducción de los genes endógenos clave en la biosíntesis de carotenoides. A su vez, se observó un incremento en el contenido de clorofila lo que correlaciona positivamente con un aumento en la eficiencia fotosintética y la expresión del gen codificante para la enzima clorofila sintasa (CHL). Por otro lado, estas líneas poseen un mayor crecimiento (vegetativo y reproductivo) y biomasa comparado con su control S/I, el cual puede explicarse por la inducción de genes involucrados en la síntesis de giberelinas (*NtCps* y *NtKs*) que explican el mayor contenido de GA4 (giberelina bioactiva) en las líneas



evaluadas. Esto nos permite concluir que la expresión heteróloga de *DcLcyb1* promueve la inducción de genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides, clorofilas y giberelinas (Cerdeira, 2015).

De los dos genes *Psy* parálogos presentes en zanahoria, el gen *Psy2* podría estar asociado a la carotenogénesis en la raíz modificada dado que presenta un aumento levemente mayor en su expresión entre la cuarta y doceava semana del desarrollo de la raíz comparado con el gen *Psy1*, el cual estaría más relacionado a la carotenogénesis en las hojas maduras (Fuentes y col., 2012). Esta evidencia nos permite sugerir una función diferencial de ambos genes durante el desarrollo de *D.carota* (Fuentes, 2011).

En nuestro laboratorio, hemos determinado la funcionalidad del gen *Psy1* de *D. carota* mediante complementación heteróloga en *E.coli* (Carvajal, 2010). Una vez realizado este estudio y comprobada la funcionalidad del gen, se utilizó un modelo vegetal para determinar la funcionalidad de los genes *Psy* de zanahoria *in planta*. Se utilizaron plantas de *Nicotiana tabacum*, las cuales expresaban los genes *Psy2* y *Psy1* de zanahoria. Los resultados indicaron que existe una correlación inversa entre los niveles de carotenoides acumulados y los niveles de transcrito del gen *Psy1* y *Psy2*. La sobre expresión de *DcPsy2* dio origen a dos líneas con un aumento significativo del contenido de carotenoides (L3 y L6), las cuales al ser sometidas a un tratamiento de 250mM NaCl presentaron un 40% y 68% de sobrevivencia comparado con su control S/ly un incremento en su peso fresco, lo cual indica que la sobre expresión de *DcPsy2* genera una tolerancia al estrés salino. Por otro lado, la sobre-expresión por sobre un umbral de *DcPsy1* condujo a una disminución significativa de los carotenoides totales en aquellas líneas de tabaco con los mayores niveles de expresión detectados. Las

líneas que presentaron un aumento en el contenido de carotenoides totales y  $\beta$ -caroteno mostraron bajos niveles de expresión de *DcPsy1* (Acevedo, 2011). Sin embargo, la expresión de ambos genes en tabaco, permitió evidenciar su función *in planta*.

## 1.6 Hipótesis

La expresión heteróloga de los genes *Psy1* y *Lcyb1* de *Daucus carota* en plantas de tabaco confiere tolerancia a estrés salino y alta intensidad luminosa, lo cual se correlaciona con un aumento en la cantidad de carotenoides y clorofilas dada por el efecto modulador del transgen en estas rutas metabólicas.

## 1.7 Objetivo general

Evaluar el efecto que ejerce la expresión heteróloga de los genes *DcLcyb1* y *DcPsy1* en el contenido de carotenoides, clorofila, tolerancia a la salinidad y estrés lumínico en plantas de tabaco.

## 1.8 Objetivos específicos

- 1) Cuantificar la expresión de los transgenes y el contenido de carotenoides y clorofilas en las líneas T<sub>1</sub> de *N. tabacum* transformadas con *DcPsy1* y *DcLcyb1*
- 2) Determinar la modulación de las rutas de síntesis de carotenoides y clorofila en las líneas transgénicas de *N. tabacum* a través del análisis de la expresión de genes endógenos

- 3) Evaluar la eficiencia del fotosistema II en las líneas *DcPsy1* y *DcLcyb1*, luego de un tratamiento de alta intensidad lumínica
- 4) Evaluar la tolerancia a estrés salino de las líneas *DcPsy1* y *DcLcyb1* de tabaco

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Reactivos de Biología Molecular

Se emplearon los reactivos de la calidad adecuada respecto a las técnicas de biología celular y molecular desarrolladas. Estos productos fueron obtenidos de las empresas y marcas registradas como Invitrogen, Fermentas, Promega, Axygen, New England Biolabs, BioRad, Merck, PhytoTechnology Laboratories, Stratagene y Sigma-Aldrich.

### 2.2 Material vegetal y condiciones de cultivo

Se utilizaron plantas de la generación  $T_1$  de *Nicotiana tabacum* cultivar Xanthi NN transformadas con la construcción pGWB2/DcLcyb1 (Moreno, 2012) y con la construcción pGWB2/DcPsy1 (Acevedo, 2011), además de plantas de tabaco silvestre (wt), del mismo cultivar, como control para los experimentos. Estas plantas fueron obtenidas de semillas de plantas de tabaco  $T_0$ , la cual fue caracterizada a nivel molecular y bioquímico (Acevedo, 2011; Moreno, 2012) y, posteriormente, se recolectaron sus semillas  $T_1$  las cuales son el material vegetal con el cual se desarrolló este trabajo.

En los trabajos previos se seleccionaron tres líneas transgénicas para la construcción pGWB2/DcLcyb1 (L14, L15, L16) y tres líneas transgénicas para la construcción pGWB2/DcPsy1 (L1B, L2A, L3B) mediante PCR para el transgen (Acevedo 2011; Moreno 2012).

Semillas de tabaco, correspondientes a la generación  $T_1$ , de las líneas antes mencionadas, fueron esterilizadas en 10 mL de hipoclorito de sodio (2,5%) durante 10

minutos en agitación y luego se realizaron 4 lavados consecutivos con agua destilada estéril. Posteriormente, fueron sembradas *in vitro* en placas Petri que contenían 25 mL de medio Murashige & Skoog sólido (MS 1%), (Murashige y Skoog, 1962) y agar-agar 7% pH 5.8, utilizando como agente de selección de plántulas transgénicas el antibiótico kanamicina (100 mg/L). Paralelamente, se sembraron semillas silvestres (wt), utilizando las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente, en ausencia del antibiótico de selección, las cuales se utilizaron como control para efectos de los ensayos. Luego de ser sembradas, tanto las semillas wt como las correspondientes a plantas transgénicas, fueron estratificadas, incubándolas durante 2 días a 4°C para sincronizar su germinación, para posteriormente ser incubadas en una cámara de cultivo de 16 horas luz (Irradiancia 150  $\mu\text{mol de quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 22°C y 50% de humedad. Para los ensayos se utilizaron aquellas plantas resistentes al antibiótico y que genotípicamente correspondían a la población hetero y homocigota para el transgen. Luego de un mes, fueron traspasadas a una mezcla de tierra:turba:vermiculita (1:1:1) para ser crecidas a 22°C en condiciones de invernadero con un fotoperíodo de 16 horas de luz (115  $\mu\text{mol de quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y 8 horas de oscuridad. Durante la primera semana de crecimiento, las plantas fueron cubiertas para aclimatarlas a las nuevas condiciones *ex vitro* y fueron regadas dos veces a la semana con la cantidad de agua necesaria, régimen de riego que se mantuvo durante todo el crecimiento de las plantas.

## 2.3 Métodos de Biología Molecular

### 2.3.1 Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos

#### 2.3.1.1 Extracción de ARN de plantas

Se colectó tejido de plantas de tabaco T<sub>1</sub> de tres meses, crecidas en condiciones de invernadero (fotoperíodo de 16 horas de luz y 22°C), utilizando nueve plantas por cada una de las líneas transgénicas analizadas y nueve plantas para el control wt, organizándolas en triplicado biológico. Cada réplica biológica constaba de un *pool* de hojas de tres plantas, con el fin de homogenizar los resultados, considerando que se está trabajando con plantas correspondientes a la generación T<sub>1</sub>.

La extracción de ARN vegetal se realizó utilizando el protocolo CTAB (Chang y col., 1993) modificado. Aproximadamente 150 mg de tejido fueron pulverizados en morteros estériles, en presencia de nitrógeno líquido. Luego, se agregó 1 mL de tampón CTAB (cetil trimetilamonio bromuro al 2%, polivinipirrolidona al 2%, NaCl 2M, EDTA 25mM y Tris pH 8 100 mM) y 4 µL de β-mercaptoetanol y se traspasó el homogenizado a un tubo Eppendorf de 2,0mL, se mezcló vigorosamente durante 15 segundos en vórtex para posteriormente incubar la mezcla durante 10 min a 65°C. Se agregó 1 mL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) frío y se agitó vigorosamente durante 15 segundos, tras los cuales se centrifugó por 15 min a 12.000×g a 4°C. Se rescató la fase acuosa en un nuevo tubo, cuidando no tomar parte de la fase orgánica, y se agregó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) frío equivalente al volumen rescatado, mezclando vigorosamente para facilitar la homogenización. Se centrifugó nuevamente durante 15 min a 12.000×g a 4°C. Una vez terminada la centrifugación, se rescató el sobrenadante y se precipitó con 0,5 volúmenes de LiCl frío durante toda la noche a -20°C. Posteriormente, se centrifugó a 12.000×g durante 15

minutos a 4°C y se lavó el precipitado obtenido con 1 mL de etanol frío 75% v/v en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). Se agitó suavemente y luego se centrifugó a 7500×g por 5 min a 4°C. Finalmente, el ARN fue secado a temperatura ambiente y resuspendido en 20 µL de agua tratada con DEPC.

La concentración y pureza de las muestras fueron cuantificadas en un espectrofotómetro EPOCH™ (Gen5™ de BioTek) en donde se determinaron las razones de absorbancia 260/280 y 260/230, indicativas de la pureza del ARN y su concentración. Con el fin de determinar la integridad de las muestras de ARN se cargaron 1µg en un gel de agarosa y se realizó la electroforesis descrita en la sección 2.3.2.

### **2.3.1.2 Extracción de ADN genómico de plantas**

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo utilizando el método CTAB (Doyle y Doyle, 1987). Aproximadamente 100 mg de tejido se molieron con nitrógeno líquido en morteros estériles, libres de nucleasas. Se agregaron 700 µL de CTAB (cetil trimetilamonio bromuro al 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20mM y Tris pH 8 100 mM) y 5 µL de β-Mercaptoetanol. El homogenizado se incubó a 60°C durante 30 min, agitando vigorosamente cada 5 minutos. Se agregó nuevamente 700 µL de CTAB y se incubó a 70°C por 15 min. Posteriormente, se añadieron 400 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min, separándose la fase acuosa de la fase orgánica. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf estéril y se precipitó el ADN con isopropanol frío por 30 min a -20°C para luego ser centrifugado a 13.000 rpm por 10 min, obteniéndose el precipitado de DNA, el cual fue lavado con etanol 70% (preparado con agua libre de nucleasas), secado a temperatura ambiente y

resuspendido en 50  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. La concentración y pureza del ADN fue cuantificada mediante espectrofotómetro (EPOCH™) y su integridad se corroboró con una electroforesis en gel de agarosa.

### **2.3.2 Electroforesis en geles de agarosa**

La integridad de los ácidos nucleicos extraídos fue verificada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 ó 2 %, dependiendo del tamaño esperado de las bandas. Se utilizó el tampón de corrida TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM), utilizando un tampón de carga 6X para las muestras (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilencianol, 15% glicerol) en la proporción 5:1. Para la migración electroforética se utilizó entre 80 y 100 voltios (dependiendo del tamaño de la cámara de electroforesis) durante 45 min para separar moléculas de ADN y 70 voltios durante 40 minutos para ARN. Posteriormente, los geles de agarosa fueron teñidos durante 20 minutos en una solución de Bromuro de Etidio 20 mg/L y se visualizaron bajo luz UV en el transiluminador DarkRoom Multigenius Syngene® a través del programa Gene Snap® de Syngene®.

### **2.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa, PCR**

#### **2.3.3.1 RT PCR**

Para la obtención de la hebra de ADNc, complementaria al ARNm, se realizó la reacción de transcripción reversa (RT-PCR), utilizando la enzima RT – Improm II (Promega). Para la primera parte del protocolo, 2,5 $\mu$ g de ARN, cuya pureza e integridad fue verificada previamente, se incubaron con 50 U de la enzima DNasa I (Fermentas), 40 U de inhibidor de RNasa Ribolock (Fermentas) y tampón de la DNasa I

1× (Fermentas) en un volumen final de reacción de 20 µL, completando el volumen con agua DEPC. La mezcla se incubó durante 40 minutos a 37°C en termociclador (MyCycler™ de BIO RAD). Pasado el tiempo de incubación, se detuvo la reacción y se agregó 1µL de EDTA 50 mM, incubando las muestras durante 10 minutos a 65°C para inactivar la enzima. Una vez finalizado el tratamiento con DNasa I, se realizó un PCR convencional para corroborar la ausencia de ADN genómico en las muestras.

Para la síntesis de ADNc, se tomaron 9,5 µL del ARN tratado con DNasa I y se incubaron con 1,5 µL de oligo AP 10 mM (5'-CGCCACGCGTCTCGACTAGTAC TTTTTTTTTTTTTTTTTT -3') durante 5 minutos a 70°C (Tabla II A) en termociclador. A continuación, se detuvo el programa y se incubaron las muestras durante 5 minutos en hielo para luego agregar a cada muestra 9 µL de la mezcla que incluía la enzima Transcriptasa Reversa (1 uL de RT Improm II Promega), 40 U de Inhibidor de RNasa (Ribolock, Fermentas), dNTPs 600 nM (Fermentas), MgCl<sub>2</sub> 6,6 mM (Promega), 4µL de tampón 5× de la RT Improm II (Promega) y continuar con el programa de RT PCR que especifica en la Tabla II para obtener finalmente un volumen final de 20 µL de ADNc.

### 2.3.3.2 PCR convencional

Las reacciones de PCR convencional se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µL, utilizando 1 U de Taq ADN Polimerasa (New England Biolabs), 1× del tampón de la enzima Taq ADN Polimerasa (New England Biolabs), MgCl<sub>2</sub> (2 mM), dNTPS(0,2 mM), 0,2 µM de partidor en sentido o antisentido y 1 µL de templado (ADN, ADNc) o agua libre de nucleasas en el caso del control negativo de la reacción.

Para la amplificación de los fragmentos de interés en las plantas transgénicas, se utilizaron los partidores para los genes *DcPsy1* y *DcLcyb1*, usando como control

positivo de cada reacción ADN genómico de plantas de *Daucus carota* y, como control negativo, agua libre de nucleasas. La mezcla para llevar a cabo la reacción fue la descrita anteriormente y las condiciones de PCR se detallan en la **Tabla II (B)**.

Para la verificación de la síntesis de ADNc, se realizó la amplificación del gen normalizador *18S*, utilizando como templado el ARN luego del tratamiento con la enzima DNasa I, en donde se corroboró la ausencia de la banda esperada en todas las muestras post tratamiento mediante electroforesis en gel de agarosa y la presencia de la banda para el control positivo de la reacción que, en este caso, correspondió a ADN genómico o ADNc de una línea de tabaco transgénica utilizada en este trabajo. Por otro lado, como control negativo se utilizó una muestra que pasó por el tratamiento con la enzima DNasa I, pero se agregó agua libre de nucleasas en lugar de ARN. Posteriormente, luego de la síntesis de ADNc, se amplificó en mismo gen para corroborar la presencia de la banda y así verificar la correcta síntesis del ADNc, utilizando como control positivo de la reacción 1  $\mu$ L de ADN genómico o ADNc de una planta de tabaco y, como control negativo, 1  $\mu$ L de agua libre de nucleasas.

Todos los productos de PCR fueron verificados mediante electroforesis en geles de agarosa. Las condiciones de PCR se describen en la Tabla II, siendo la temperatura de hibridación específica para cada par de partidores.

### **2.3.3.3 PCR cuantitativo en Tiempo Real**

Se llevaron a cabo experimentos de PCR cuantitativo en Tiempo Real para cuantificar los niveles de expresión de los genes de interés en este trabajo (*DcLcyb1*, *DcPsy1*, *18S*, *NtPsy1*, *NtPsy2*, *NtLcyb1*, *NtChl*) con oligonucleótidos que fueron previamente diseñados y evaluados (Acevedo, 2013; Cerda, 2015) (Tabla I). Los

experimentos se llevaron a cabo en un termociclador Mx3000P (Stratagene), utilizando la sonda fluorescente SYBRgreen (kit Brilliant III Ultra – FastSYBR® Green QPCR Master Mix- Stratagene). El volumen final de reacción fue de 20  $\mu$ L, conteniendo 10  $\mu$ L de Master Mix (TaqADN polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y SYBR green), 0,6  $\mu$ L del partidador en sentido, 0,6  $\mu$ L del partidador en antisentido (10  $\mu$ M) 0,3  $\mu$ L de una dilución 1:500 de la sonda pasiva ROX y fue llevado al volumen final con agua libre de nucleasas, utilizando el programa q PCR, indicado en la Tabla II (C). Se utilizaron nueve plantas transgénicas por línea, como también para el control wt, organizadas en tres réplicas biológicas. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en triplicado biológico y duplicado técnico. La especificidad de reacción para cada set de partidadores fue verificada por la presencia de una sola señal en un gráfico de fluorescencia v/s T° en la curva de denaturación del producto de PCR correspondiente.

Para efecto de los resultados, todas las cuantificaciones fueron relativizadas a un calibrador, que corresponde a una condición de mínima expresión para el caso de esta tesis. Por otro lado como gen normalizador, cuya expresión es constante en plantas (*housekeeping*), se utilizó el gen de *18S*. Los cálculos de la expresión relativa se llevaron a cabo según Pfaffl (2001).

**Tabla 1 Partidores utilizados en esta tesis**

Nombre	Secuencia (5'3')	TM °C	Tamaño producto (pb)	Descripción
<i>DcLcyb1 F</i>	TTGACCTTCCTTTGTATGACCCGTC	58,7	107	Fragmento del Gen <i>Lcyb1</i> de <i>D. Carota</i>
<i>DcLcyb1 R</i>	TCCTGCCTCAGAAACTTGTGTGC	59,8		
<i>DcPsy1 F</i>	ATCGGTGTGGCGAAGTTTGT	57,4	140	Fragmento del Gen <i>Psy1</i> de <i>D. Carota</i>
<i>DcPsy1 R</i>	CAAGAGCCTTGGGCGTGATA	57,4		
<i>Nt18SF</i>	CTGAGAAACGGCTACCACATCCA	58,9	170	Gen ARN Ribosomal 18S. Utilizado como normalizador
<i>Nt18SR</i>	CACCAGACTTGCCCTCCAATGG	60,4		
<i>NtPsy1F</i>	GGAACCAAGCTAATGACCCCAGAGAGA	58,1	164	Fragmento del Gen <i>Psy1</i> de <i>N. tabacum</i>
<i>NtPsy1R</i>	GGCCGCCCACTGAAAATATCTTCC	58,6		
<i>NtPsy2 F</i>	TCAGAGATGTTGGAGAAGATGC	58,4	130	Fragmento del Gen <i>Psy2</i> de <i>N. tabacum</i>
<i>NtPsy2 R</i>	GCTTCAATCTCGTCCAATATCTTG	57,3		
<i>NtChl F</i>	ATCAAATATGGGTGCTTCTTCTTGGAGG	58,8	250	Fragmento del gen <i>Chl</i> de <i>N. tabacum</i>
<i>NtChl R</i>	ATTATGTCAGGTGTAAGGGTGCCGAACA	61,5		
<i>NtLcyb1F</i>	CCGTGTTAAATTCCACCACGCCAA	59,6	132	Fragmento del gen <i>Lcyb1</i> de <i>N. tabacum</i>
<i>NtLcyb1 R</i>	GAAGCCAGTTGCATCAAGCACCAC	59,8		

**Tabla 2 Programas de PCR utilizados en esta tesis**

**A. RT-CR**

Segmento	Pasos		N° de Ciclos
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	
1	70	5	1
	25	5	
	42	60	
	70	15	

**B. PCR convencional**

Segmento	Pasos		N° de Ciclos
	Temperatura (°C)	Tiempo	
1	94	3 min	1
2	94	45 s	30
	57	45 s	
	68	45 s	
	68	10 min	

**C. PCR Cuantitativo en Tiempo Real**

Segmento	Pasos		N° de Ciclos
	Temperatura (°C)	Tiempo	
1	95	3 min	1
2	95	10 s	40
	60	20 s	
3	95	1 min	1
	60	30 s	
	95	30 s	

## **2.4 Determinación de la cantidad y composición de carotenoides**

### **2.4.1 Extracción de carotenoides desde plantas de *Nicotina tabacum***

El tejido vegetal utilizado para la extracción de pigmentos fue el mismo con el que se llevó a cabo el análisis molecular (**Materiales y Métodos 2.3.1.1 y 2.3.3.3**). Se utilizaron 100 mg de tejido el cual se molió en un mortero en presencia de N<sub>2</sub> líquido y se homogenizó con 4 mL de una solución hexano/acetona/etanol (2:1:1) (v/v). El homogenizado se recolectó y agitó vigorosamente durante dos minutos y se mantuvo en hielo y oscuridad. Posteriormente, se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min a 4°C. Los carotenoides fueron recuperados de la fase superior, la cual fue traspasada a un tubo eppendorf de 2 mL y fue secada en un rotor speed-vac® durante 40 min a temperatura media. Una vez secas, las muestras fueron almacenadas a -80° C para su posterior cuantificación.

### **2.4.2 Cuantificación de pigmentos totales mediante espectrofotometría**

Las muestras, almacenadas a -80 °C, fueron resuspendidas en 2mL de acetona. Se midió la absorbancia a 474 nm (absorción de carotenoides), 645/662 nm (absorción de clorofilas *a* y *b*) y 520/750 nm (valor que indica turbidez de la muestra). Todas las mediciones se realizaron en una cubeta de cuarzo y se consideró un rango entre 0,3 y 0,85 para las mediciones de absorbancia, diluyendo la muestra cuando fue necesario. La concentración de pigmentos totales fue expresada en µg/g de peso seco, utilizando el factor obtenido luego de someter 1g de tejido de hojas de tabaco a 60°C durante 24 horas (Lichtenthaler y Buschmann, 2001). Se calculó la concentración de carotenoides totales, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Pigmentos totales} = \frac{\text{Volumen de resuspensión}^*(\text{mL}) \times \text{Absorbancia (474)} \times 100}{21 \times \text{Peso Seco (g)}^{**}}$$

\*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 cociente 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)**

Se utilizó la técnica de HPLC en fase reversa (RP-HPLC) para determinar la composición y cantidad de los pigmentos presentes en las muestras obtenidas a partir de la extracción realizada. Del extracto, resuspendido en 1 mL de acetona (Merck®), se utilizaron 20 µL para el análisis, el cual fue llevado a cabo en una columna MultoHigh 100 RP 18-5µ (150×4,6 mm), usando como fase móvil acetonitrilo/metanol/isopropanol (85/10/5 v/v), con un flujo isocrático de 1,5 mL/min en un equipo de HPLC Shimadzu modelo LC-10 AT con detector de arreglo de diodos. Los principales carotenoides coloreados fueron detectados a 474 nm en conjunto con las clorofilas *a* y *b*.

La concentración de los principales compuestos carotenoides y clorofilas presentes en las muestras fue determinada en función del análisis de los cromatogramas, la concentración de pigmentos totales por espectrofotometría ( $\lambda_{474}$ ), tiempos de retención y espectros de absorción, utilizando el programa computacional LC-Solutions®, el cual determinó la cantidad de cada carotenoide como el área bajo la curva de cada pico.

## 2.5 Medición de la actividad del PSII

La actividad del fotosistema II fue medida en plantas de tabaco de tres meses transformadas con los vectores *PGWB2/DcPsy1* y *PGWB2/DcLcyb1*, las cuales fueron sembradas en medio MS (pH=5,8, sin sacarosa, kan 100 mg/L) y plantas de tabaco *wt* sembradas en las mismas condiciones de cultivo, pero en ausencia del antibiótico de selección. Luego de un mes, fueron trasplantadas a una mezcla de tierra:turba:vermiculita (1:1:1) para ser crecidas en condiciones de invernadero descritas anteriormente (**Materiales y Métodos 2.2**). Se realizaron mediciones de eficiencia fotoquímica del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) en condiciones control (plantas sin estrés lumínico) y luego fueron sometidas a 20 minutos de estrés lumínico (radiación solar directa). Posteriormente, se oscureció durante 30 minutos la hoja en la que se realizó la medición utilizando pinzas foliares. Las mediciones fueron llevadas a cabo al mediodía, en hojas de los nudos distales, de edad intermedia, que mostraban un óptimo desarrollo. La eficiencia fotoquímica máxima fue medida según la siguiente fórmula:

$$F_v/F_m = \frac{(F_m - F_0)}{F_m}$$

en donde la fluorescencia mínima ( $F_0$ ) fue medida aplicando un pulso de luz roja modulada de baja intensidad ( $2 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y la fluorescencia máxima ( $F_m$ ), aplicando un pulso de luz actínica saturante ( $3500 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Todas las mediciones fueron llevadas a cabo utilizando un fluorómetro Fms1 (Hansatech), equipo facilitado por el Dr. Claudio Pastenes (Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Agronomía de la Universidad de Chile).

## 2.6 Ensayo de peroxidación lipídica

Para llevar a cabo este objetivo, se cortaron discos de hoja de aproximadamente 200 mg de plantas de tres meses transformadas con *pGWB2/DcPsy1* y *pGWB2/DcLcyb1* y un control wt, eligiendo aquellas hojas de edad intermedia. Los discos fueron inmersos en una solución de 250 mM de NaCl y luego fueron infiltrados al vacío durante 30 minutos. Posteriormente, se mantuvieron a temperatura ambiente y se midió el contenido de malondialdehído (MDA) a los tres días de tratamiento (Chen y col., 2011). Se utilizó un número total de nueve plantas, distribuidas en tres réplicas biológicas por línea tanto para plantas tratadas con NaCl como plantas control (sin tratamiento). El tejido fue homogenizado con 4 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% y luego, las muestras fueron centrifugadas a 10000×g por 15 minutos. Posteriormente, se rescató el sobrenadante y se mezcló con 2 mL de TCA 20% y 2 mL de ácido Tíobarbitúrico (TBA) 0,5%. Finalmente, el homogenizado fue llevado a 95°C por un tiempo de 30 minutos y luego se enfrió sobre hielo. La absorbancia del sobrenadante fue leída a 532 nm y 600 nm y la concentración de malonildialdehído (MDA) fue calculada utilizando la ecuación de Beer Lambert's, siendo el coeficiente de extinción molar  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## 2.7 Ensayo de Fuga Electrolítica

Con el fin de evaluar el grado de daño en la membrana celular generado por el estrés salino, las líneas transgénicas fueron sometidas a un tratamiento agudo con NaCl 250 mM durante 12 y 24 horas. Para llevar a cabo este ensayo, se sembraron semillas de tabaco wt y T<sub>1</sub> de las líneas transgénicas *pGWB2/DcPsy1* y *pGWB2/DcLcyb1* en placas Petri que contenían medio MS 1% pH 5,8 sin sacarosa,

agar-agar al 7% , kan 100 mg/L para las líneas transgénicas y en ausencia del antibiótico de selección, para el caso de plantas wt. Se sembraron 75 semillas T1 por línea en medio de selección. Luego de 17 días en medio de selección, se seleccionaron 30 plántulas de tabaco por presentar mayor vigor y crecimiento para someterlas al tratamiento salino agudo. Las plántulas fueron lavadas en agua desionizada a temperatura ambiente, para remover remanentes de agar e impurezas y tratadas posteriormente por 12 horas en una solución 250 mM NaCl, más un control sin NaCl por cada punto. Las mediciones fueron llevadas a cabo en tres réplicas biológicas cada una de ellas compuesta por un *pool* de cinco plántulas por línea. Para dar mayor robustez a los resultados, el experimento fue llevado a cabo en duplicado. Cumplidas las horas del tratamiento, las plántulas fueron secadas en papel absorbente y lavadas en agua desionizada para eliminar remanentes de sal. Luego, fueron secadas nuevamente en papel absorbente para luego traspasarlas a vasos precipitados con 20 mL de agua desionizada, donde se midió la conductividad eléctrica con un conductímetro (Hanna Instruments) antes de traspasar las plántulas (conductividad inicial  $C_i$ ) y a los 0 y 40 minutos (conductividad final  $C_f$ ), luego del traspaso. Posteriormente, cada uno de los vasos precipitados fue autoclavado y se midió la conductividad total ( $C_t$ ) cuando las muestras alcanzaron temperatura ambiente. Finalmente, la fuga de electrolitos fue expresada según la siguiente fórmula:

$$\frac{(EC_f - EC_i)}{(EC_t - EC_i)} \times 100$$

## **2.8 Evaluación de la tolerancia a estrés salino crónico de plantas transformadas con el gen *DcPsy1* y *DcLcyb1***

Para evaluar la tolerancia a estrés salino crónico, se sembraron semillas de tabaco transformadas con *pGWB2/DcPsy1* y *pGWB2/DcLcyb1* en medio MS (sin sacarosa, kan 100 mg/L, pH= 5,8), y semillas de plantas wt en las mismas condiciones, pero en ausencia del antibiótico de selección, las cuales crecieron durante 13 días. Luego, aquellas plántulas de tabaco con al menos cuatro hojas y coloración verde, fueron trasplantadas a un medio *in vitro* MS (sin sacarosa, pH= 5,8) el cual fue suplementado con 250 mM NaCl y permanecieron en estas condiciones durante 16 días. Paralelamente, se contó con el control respectivo para cada línea y plantas wt, el cual creció en las mismas condiciones que las plántulas sometidas al tratamiento salino, pero en medio MS en ausencia del NaCl. Llegado el día 16, se determinó el peso fresco de plántulas control y plántulas en tratamiento.

## **2.9 Análisis estadísticos**

Para procesar los datos de cada experimento se utilizó el programa GraphPad y una prueba de t de Student de dos colas o test de análisis de varianza (ANDEVA) con un post test de Tukey o Dunnet, según correspondió, con un  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0,001$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Expresión relativa de los genes *DcPsy1* y *DcLcyb1* y contenido de carotenoides y clorofilas en las líneas T<sub>1</sub> de *N. tabacum* transgénicas

En primera instancia, se evaluó la expresión relativa de los genes *DcPsy1* y *DcLcyb1*, en las líneas T<sub>1</sub> de *N. tabacum* para corroborar que expresaran el transgen al igual que las líneas parentales T<sub>0</sub> de donde provienen, obtenidas anteriormente en nuestro laboratorio (Acevedo, 2011; Moreno, 2012). Posteriormente, se prosiguió con la evaluación del contenido de carotenoides y clorofilas a partir del mismo grupo de líneas en estudio.

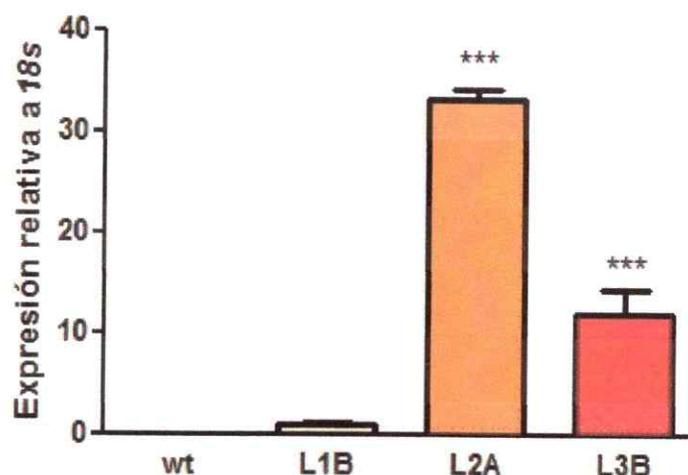
##### 3.1.1 Evaluación de la expresión de los genes *DcPsy1* y *DcLcyb1* en las líneas transgénicas de *N. tabacum*

Para evaluar la expresión del transgen *Psy1* y *Lcyb1* de *D. carota*, se utilizaron tres réplicas biológicas por línea, cada una compuesta por hojas de tres plantas distintas para cada línea evaluada (líneas 1B, 2A y 3B transformadas con el vector pGWB2/*DcPsy1* y las líneas L14, L15 y L16 transformadas con el vector pGWB2/*DcLcyb1*) además del control, el cual correspondió a plantas de tabaco de igual edad y crecidas bajo las mismas condiciones que las líneas de tabaco transgénicas pGWB2/*DcPsy1* y pGWB2/*DcLcyb1*, las cuales no fueron transformadas con el vector pGWB2. Las líneas transgénicas T<sub>1</sub> fueron seleccionadas por crecimiento en medio de selección *in vitro* en presencia de kanamicina (Materiales y Métodos 2.2) y seleccionadas por su fenotipo más vigoroso. Luego, nueve plantas por línea transgénica y control wt, fueron crecidas en condiciones de invernadero hasta los tres

meses, período en que se realizó la toma de muestras. Se extrajo ARN total de las distintas réplicas biológicas y se evaluó mediante la técnica de PCR en Tiempo Real la expresión de ambos genes.

### **3.1.1.1 Evaluación de la expresión del gen *Psy1* de *D. carota* en las líneas de tabaco pGWB2/*DcPsy1***

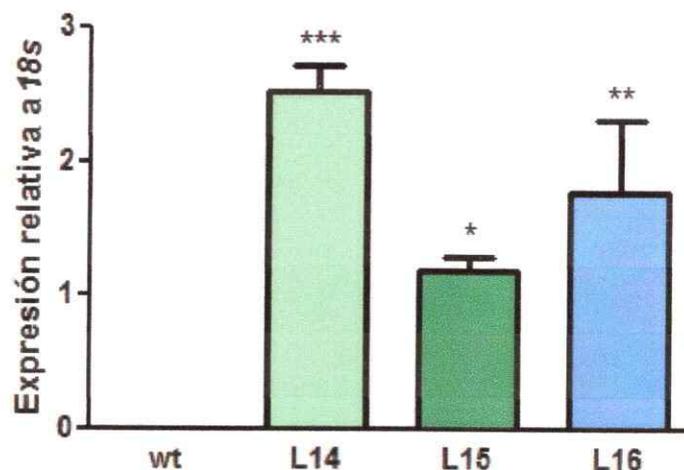
Los resultados del experimento mostraron que *DcPsy1* se expresó de forma diferencial entre las líneas 1B, 2A y 3B, en donde la línea 1B mostró una acumulación de transcritos que no fue significativa respecto al control wt, mientras que las líneas 2A y 3B mostraron elevada acumulación del transcrito para el transgen (**Figura 1**). Con esta información se comprueba que todas las líneas T<sub>1</sub> de tabaco transformadas con la construcción pGWB2/*DcPsy1* expresan el gen *Psy1* de *Daucus carota* de forma diferencial, obteniendo niveles de expresión significativos para dos de las líneas y no significativo para una de ellas respecto al control wt.



**Figura 1. Niveles de expresión de *DcPsy1* en las líneas transgénicas de tabaco.** Se determinaron los niveles de expresión relativos del gen *Psy1* de *D. carota* en tejido de hojas de las líneas transgénicas 1B, 2A y 3B y control wt (plantas de 3 meses de edad). Cada valor corresponde al promedio de 3 réplicas biológicas y dos réplicas técnicas. Los valores de expresión relativa fueron normalizados respecto al gen *18S* y se utilizó como calibrador la línea L1B la cual se definió como nivel 1 de expresión relativa. Los asteriscos indican diferencias significativas de cada valor comparado con el control wt. Estas diferencias se determinaron por un test ANDEVA de una vía y un post test de Dunnet, \*\*\*  $p < 0.001$  wt: planta de tabaco silvestre.

### 3.1.1.2 Evaluación de la expresión del gen *Lcyb1* de *D. carota* en las líneas de tabaco pGWB2/*DcLcyb1*

Los datos muestran que las tres líneas transgénicas de tabaco evaluadas, portadoras de la construcción pGWB2/*DcLcyb1*, poseen niveles de expresión similares y significativos respecto al control sin transformar wt (**Figura 2**). Se observa que la línea 14 posee los niveles más altos de acumulación de transcritos de ARNm en comparación con el resto de las líneas, seguida por la línea 16 y, en último lugar, la línea 15. Con esta información se comprueba que todas las líneas de tabaco T<sub>1</sub> transformadas con la construcción pGWB2/*DcLcyb1* expresan el gen *Lcyb1* de *Daucus carota*.



**Figura 2. Niveles de expresión de *DcLcyb1* en las líneas transgénicas de tabaco.** Se determinaron los niveles de expresión relativos del gen *Lcyb1* de *D. carota* en tejido de hojas de las líneas transgénicas 14, 15 y 16 (plantas de 3 meses de edad). Cada valor corresponde al promedio de 3 réplicas biológicas y dos réplicas técnicas. Los valores de expresión relativa fueron normalizados respecto al gen *18s* y se utilizó como calibrador la línea L15. Los asteriscos indican diferencias significativas de cada valor comparado con el control wt. Estas diferencias se determinaron por un test ANDEVA de una vía y un post test de Dunnet, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  wt: planta de tabaco silvestre.

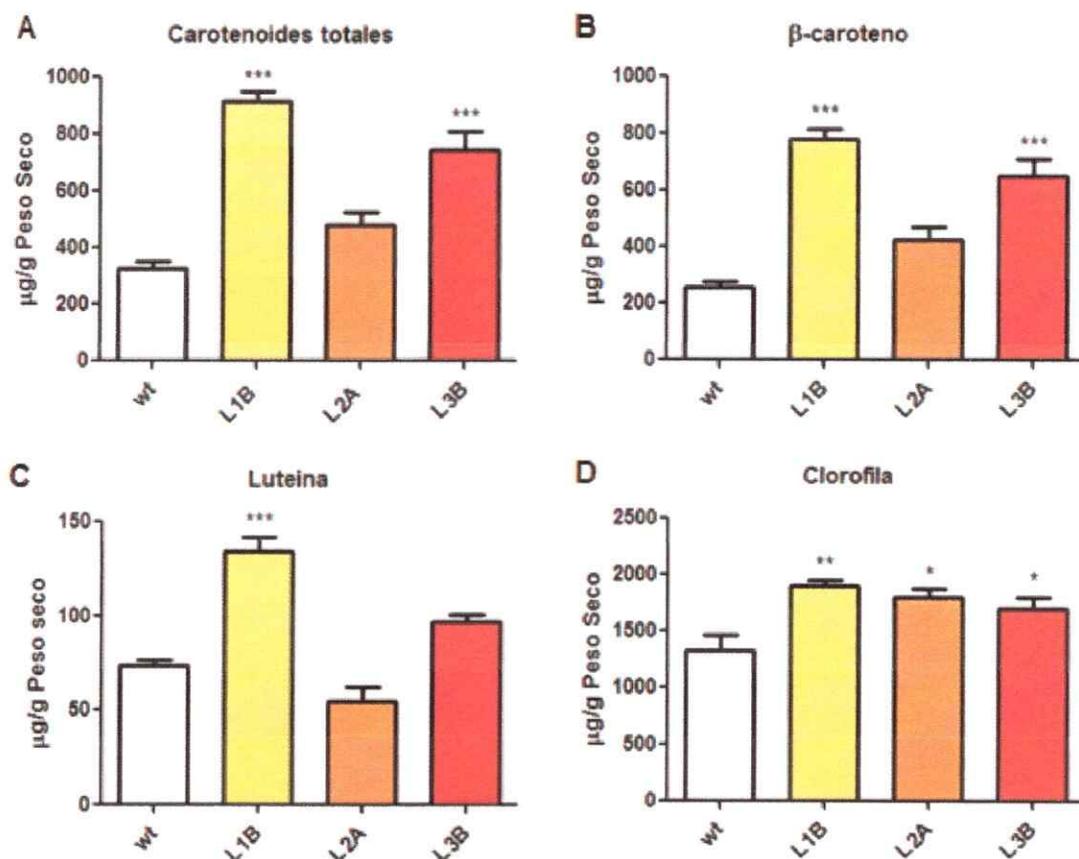
### 3.1.2 Determinación del contenido de carotenoides y clorofilas en las líneas pGWB2/*DcPsy1* y pGWB2/*DcLcyb1* de *N. tabacum*

Para determinar el contenido de carotenoides en las líneas transgénicas pGWB2/*DcPsy1* y pGWB2/*DcLcyb1*, se realizó una extracción de pigmentos de tejido foliar a tres réplicas biológicas, cada una de ellas compuesta por hojas de las mismas tres plantas por línea usadas para los análisis de expresión cuantitativa (**Materiales y Métodos 2.4**). Posteriormente, se cuantificaron carotenoides totales y clorofilas mediante espectrofotometría y carotenoides específicos mediante RP-HPLC.

### 3.1.2.1 Determinación del contenido de carotenoides y clorofilas en las líneas pGWB2/DcPsy1

Los resultados indican que existe una acumulación diferencial en cuanto al contenido de carotenoides totales,  $\beta$ -caroteno y luteína en las líneas transgénicas para pGWB2/DcPsy1 (Figura 3). Las líneas 1B y 3B muestran diferencias significativas en cuanto a la cantidad de carotenoides totales al comparar con el control wt, presentando entre 2,4 y 2 veces de aumento, respectivamente. En contraste, la línea 2A no muestra un cambio en el contenido total de estos pigmentos comparado con plantas wt, como tampoco muestra diferencias significativas en cuanto al contenido de  $\beta$ -caroteno y luteína. La línea 3B muestra un aumento de 2,6 veces en el contenido de  $\beta$ -caroteno respecto al control sin transformar y no muestra variación en el contenido de luteína. Solo la línea 1B incrementó su cantidad de  $\beta$ -caroteno (3,1 veces) y luteína (1,8 veces) y, a su vez, es la línea con menor expresión del gen *Psy1* de *D. carota*, mientras que la línea 2A posee los mayores niveles de acumulación de transcritos de éste, sugiriendo que existe una correlación negativa entre estas variables.

Por otro lado, las tres líneas transgénicas analizadas mostraron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de clorofila total cuantificada respecto al control wt (1,3 veces respecto a wt). Los valores de cuantificación de este pigmento alcanzaron un promedio de 1800  $\mu\text{g/g}$  de peso seco, mientras que el control wt presenta un promedio de 1400  $\mu\text{g/g}$  de peso seco.

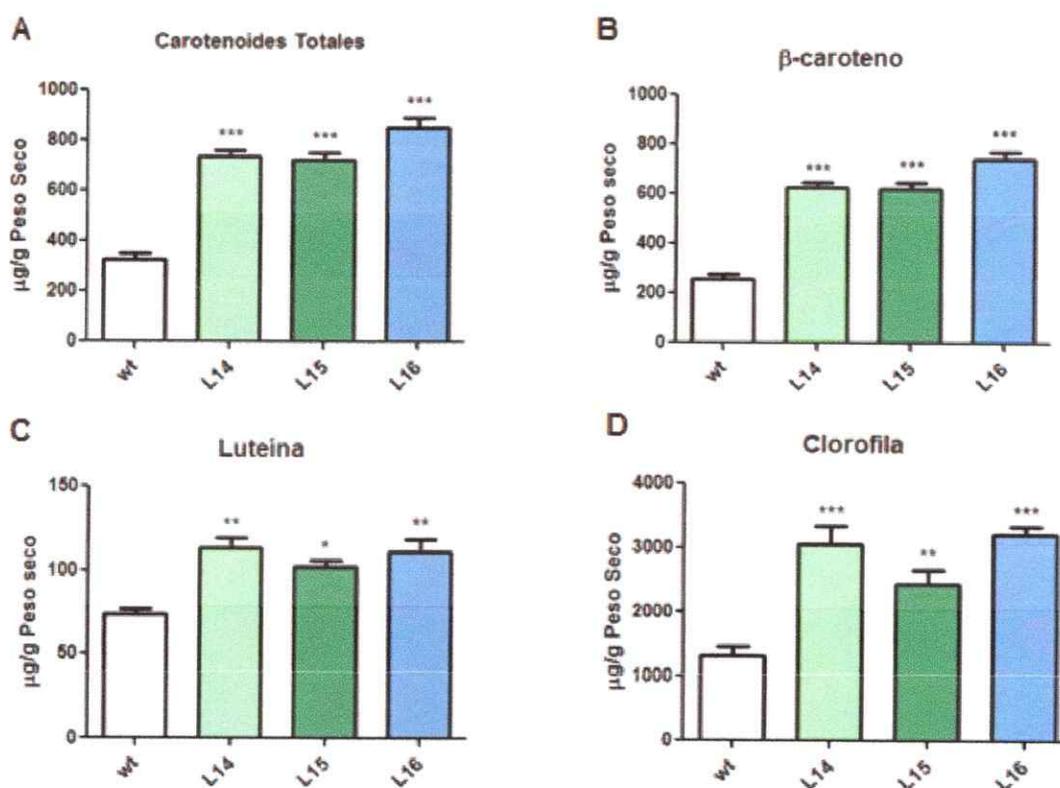


**Figura 3. Concentración de pigmentos en las líneas transgénicas *DcPsy1* de *N. tabacum*.** Cuantificación mediante espectrofotometría para el caso de carotenoides totales y HPLC para pigmentos específicos ( $\beta$ -caroteno, luteína y clorofila) en las líneas 1B, 2A y 3B. (A) Cuantificación de carotenoides totales, (B) Cuantificación de  $\beta$ -caroteno, (C) Cuantificación de Luteína, (D) Cuantificación de clorofila (clorofila *a* y *b*). Los asteriscos indican diferencias significativas de cada valor comparado con el control wt. Estas diferencias se determinaron por un test ANDEVA de una vía y un post test de Dunnet, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  wt: planta de tabaco silvestre.

### 3.1.2.2 Determinación del contenido de carotenoides y clorofilas en las líneas *pGWB2/DcLcyb1*

Como se observa en la **Figura 4**, existe un incremento de aproximadamente el doble en el contenido de carotenoides totales en las líneas 14, 15 y 16 al ser comparadas con el control wt, alcanzando valores entre los 700 y 800  $\mu\text{g/g}$  de peso

seco. El análisis por RP-HPLC indicó que los pigmentos carotenoides específicos más abundantes fueron luteína y  $\beta$ -caroteno. Las tres líneas transgénicas para pGWB2/*DcLcyb1* mostraron diferencias significativas en cuanto a la acumulación de ambos pigmentos respecto al control wt, mostrando incrementos de 2,6 veces en  $\beta$ -caroteno y 1,5 veces de luteína en promedio, respecto al wt, siendo la L16 aquella que más acumuló  $\beta$ -caroteno, mostrando un incremento de 3 veces respecto a wt.



**Figura 4. Concentración de pigmentos en las líneas transgénicas *DcLcyb1* de *N. tabacum*.** Cuantificación mediante espectrofotometría en el caso de carotenoides totales y HPLC para pigmentos específicos ( $\beta$ -caroteno, luteína y clorofila) en las líneas 14, 15 y 16. **(A)** Cuantificación de carotenoides totales, **(B)** Cuantificación de  $\beta$ -caroteno, **(C)** Cuantificación de Luteína, **(D)** Cuantificación de clorofila (clorofila *a* y *b*). Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor comparado con el control wt. Estas diferencias se determinaron por un test ANDEVA de una vía y un post test de Dunnet, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  wt:

planta de tabaco silvestre.

Por otro lado, se cuantificó también la cantidad de clorofila presente en las hojas debido a su estrecha relación funcional con los carotenoides, observándose un incremento de aproximadamente dos veces en todas las líneas evaluadas, comparando con el control wt (Figura 4).

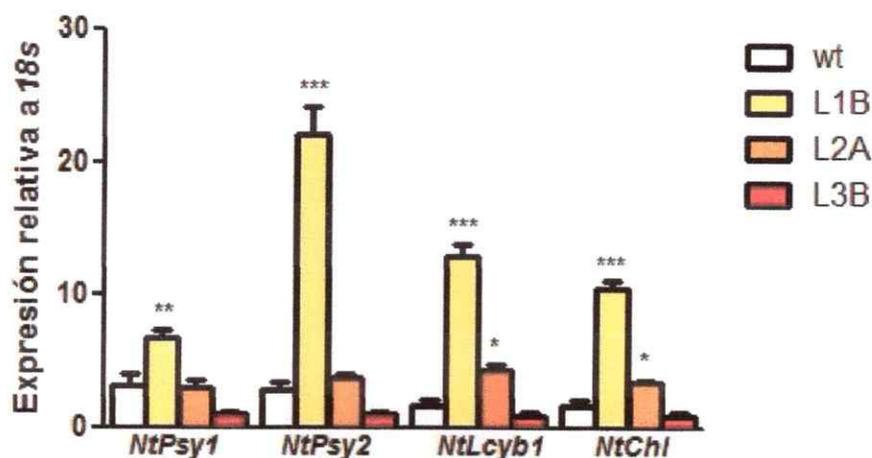
### **3.2 Evaluación de la expresión de genes endógenos involucrados en la síntesis de carotenoides y clorofilas**

Considerando que se cuenta con dos líneas transgénicas (L1B, L2A) que presentan una acumulación diferencial de carotenoides en respuesta a la expresión del transgen, se cuantificó la expresión de genes que han sido reportados como claves en la ruta carotenogénica de las plantas (*Psy1*, *Psy2* y *Lcyb*), para así determinar posibles alteraciones en la ruta endógena de síntesis de carotenoides en tabaco que pudieran dar cuenta de estas distintas respuestas frente a la expresión del transgen. Este análisis se basa en resultados previos de nuestro laboratorio que mostraron que la sobreexpresión del gen *DcLcyb1* en *D. carota* altera la expresión de los genes endógenos *Psy1*, *Psy2* y *Lcyb2* (Moreno y col., 2013). A su vez, la expresión de este mismo gen en la generación T<sub>0</sub> de las líneas transgénicas de *N. tabacum* también alteró la acumulación de transcritos de los genes aquí evaluados (Moreno, 2012). En cuanto al gen *Psy* de *D. carota*, los antecedentes de nuestro laboratorio indican que plantas de tabaco que expresaron constitutivamente el gen *DcPsy2*, mostraron una reducción en el nivel de transcritos tanto para *NtPsy1* como para *NtPsy2*.

Por otro lado, para responder el aumento en el contenido de clorofilas totales en todas las líneas transgénicas evaluadas en este trabajo (Figura 3 y Figura 4) y considerando la estrecha relación funcional con los carotenoides, se incluyó en este análisis el gen codificante para la clorofila sintasa (*Chl*). Para la evaluación de los genes de interés, mediante qPCR, se utilizaron los partidores indicados en la Tabla I (Materiales y Métodos). Para todos los genes se evaluó la cantidad relativa de ARNm para comparar su expresión entre el control wt, que carece del transgen, y las líneas de tabaco transgénicas pGWB2/*Psy1* y pGWB2/*Lcyb1*.

### **3.2.1 Evaluación de la expresión relativa de genes endógenos involucrados en la síntesis de carotenoides y clorofilas en plantas pGWB2/*DcPsy1* de *N. tabacum***

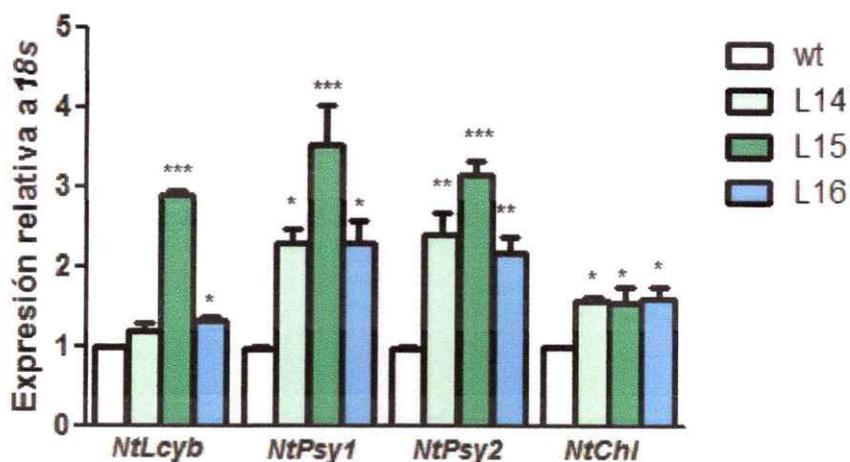
Respecto a los genes carotenogénicos endógenos, se observa que existe una mayor cantidad de transcrito en la línea 1B, para todos los genes evaluados, la cual es significativa al comparar con el control wt. Respecto a la línea 2A, solo mostró una acumulación significativa de transcritos de los genes *NtLcyb1* y *NtChl* al comparar con el control wt, mostrando un incremento de 2,6 y 2 veces, respectivamente, mientras que la línea 3B fue aquella que mostró menores niveles de expresión relativa en todos los genes endógenos evaluados.



**Figura 5. Niveles de expresión de genes endógenos de síntesis de carotenoides y clorofilas en las líneas pGWB2/DcPsy1 de tabaco.** Se observan los niveles de expresión relativos de los genes endógenos *Psy1*, *Psy2*, *Lcyb1* y *Chl* de tabaco en tejido de hojas de las líneas transgénicas 1B, 2A y 3B (plantas de 3 meses de edad). Cada valor corresponde al promedio de 3 réplicas biológicas, cada una compuesta de tres plantas y dos réplicas técnicas. Los valores de expresión relativa fueron normalizados respecto al gen *18S* y se utilizó como calibrador aquella línea que poseía los menores niveles de expresión (L3B). Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor comparado con el control wt. Estas diferencias se determinaron por un test ANDEVA de una vía y un post test de Dunnet, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  wt: planta de tabaco silvestre.

### 3.2.2 Evaluación de la expresión relativa de genes endógenos involucrados en la síntesis de carotenoides y clorofilas en plantas pGWB2/DcLcyb1 de *N. tabacum*

En el caso de las líneas 14, 15 y 16, se observa en la **Figura 6** que existe una tendencia generalizada al aumento en el nivel de transcritos de los genes endógenos evaluados al ser comparados con el control sin transformar wt. Este aumento se acentúa en el caso de la línea 15, mostrando un aumento de 3 veces en promedio para los genes *NtLcyb1*, *NtPsy1* y *NtPsy2*. En el caso del gen *NtChl*, se observa una tendencia al aumento homogéneo entre las tres líneas analizadas, la cual es significativa al comparar con el control wt.

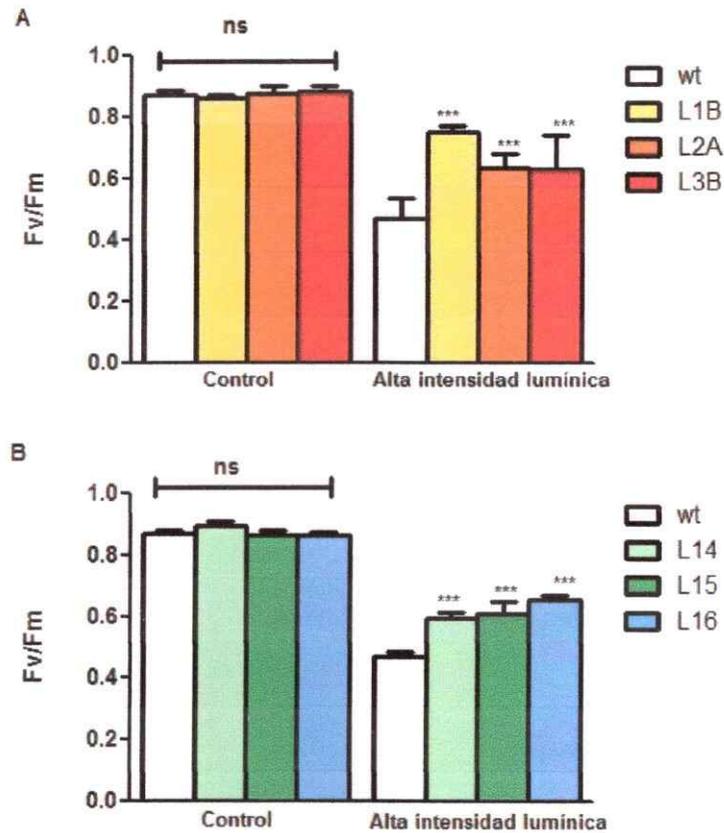


**Figura 6. Niveles de expresión de genes endógenos de síntesis de carotenoides y clorofilas en las líneas pGWB2/DcLcyb1 de tabaco.** Se muestran los niveles de expresión relativos de los genes endógenos *NtPsy1*, *NtPsy2*, *NtLcyb1* y *NtChl* de tabaco en tejido de hojas de las líneas transgénicas 14, 15 y 16 (plantas de 3 meses de edad). Cada valor corresponde al promedio de 3 réplicas biológicas, y dos replicas técnicas. Los valores de expresión relativa fueron normalizados respecto al gen *18S* y se utilizó como calibrador el control wt, que poseía los menores niveles de expresión. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor comparado con el control wt. Estas diferencias se determinaron por un test ANDEVA de una vía y un post test de Dunnet, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  wt: planta de tabaco silvestre.

### 3.3 Medición de la actividad del fotosistema II en plantas pGWB2/DcPsy1 y DcLcyb1 bajo alta intensidad lumínica

Dado que se observó un mayor contenido de clorofila en las plantas transgénicas como también una inducción del gen endógeno de la clorofila sintasa de tabaco (*NtChl*), se evaluó el efecto de la expresión de los transgenes *DcPsy1* y *DcLcy1* en los mecanismos de fotoprotección. Para ello se midió la eficiencia del fotosistema II, en función de la fluorescencia de la clorofila mediante el cociente  $F_v/F_m$ , tanto para las líneas transgénicas pGWB2/DcPsy1 (1B, 2A, 3B) como para las líneas pGWB2/DcLcyb1 (14, 15, 16) y el control wt, en un grupo de 10 plantas de tres meses para cada línea y control. La condición basal, previa a la exposición a la radiación solar

directa de alta intensidad lumínica, indica que las plantas no presentan fotoinhibición ya que el análisis muestra valores superiores a 0,8, los cuales son indicativos de un estado óptimo del PSII (Figura 7). Esta medición fue realizada para corroborar que los resultados observados se debían únicamente al tratamiento de estrés aplicado, que en este caso fue estrés lumínico, ya que estas plantas fueron crecidas bajo condiciones de invernadero a menor intensidad lumínica, por lo que una radiación solar directa de condiciones de campo debiese generar estrés en plantas crecidas bajo un flujo fotónico menor. Los resultados indicaron que, luego de 20 minutos de exposición a radiación solar directa, todas las líneas transgénicas analizadas y el control wt experimentaron una fotoinhibición. Sin embargo, las líneas transgénicas presentaron una eficiencia fotosintética mayor comparadas con el control silvestre (wt) (Figura 7), indicando un mayor actividad del PSII y menor fotoinhibición de las plantas transgénicas comparadas con el control sin transformar. Estos resultados manifiestan que, tanto las líneas transgénicas para *DcLcyb1* como las líneas *DcPsy1*, presentaron una mayor tolerancia al estrés aplicado, mientras que el control wt mostró valores de  $F_v/F_m$  menores, indicando mayor fotoinhibición, lo cual se traduce en un efecto negativo del estrés en su eficiencia fotoquímica y una menor tolerancia al tratamiento lumínico aplicado.



**Figura 7. Medición de la eficiencia del PSII en líneas transgénicas. (A)**  $F_v/F_m$  para líneas pGWB2/DcPsy1 y el control wt **(B)**  $F_v/F_m$  para líneas pGWB2/DcLcyb1 y el control wt. Las mediciones fueron realizadas previas al tratamiento de estrés lumínico (control) y post tratamiento de estrés lumínico en plantas de 3 meses. Los asteriscos indican diferencias significativas existentes entre cada línea con el control wt con tratamiento de estrés lumínico. Estas diferencias se determinaron por un test ANDEVA de una vía y un post test de Dunnet, \*\*\*  $p < 0.001$  wt: planta de tabaco silvestre, ns: no significativo.

### 3.4 Evaluación de la tolerancia a estrés salino en las líneas pGWB2/DcPsy1 y pGWB2/DcLcyb1 de tabaco

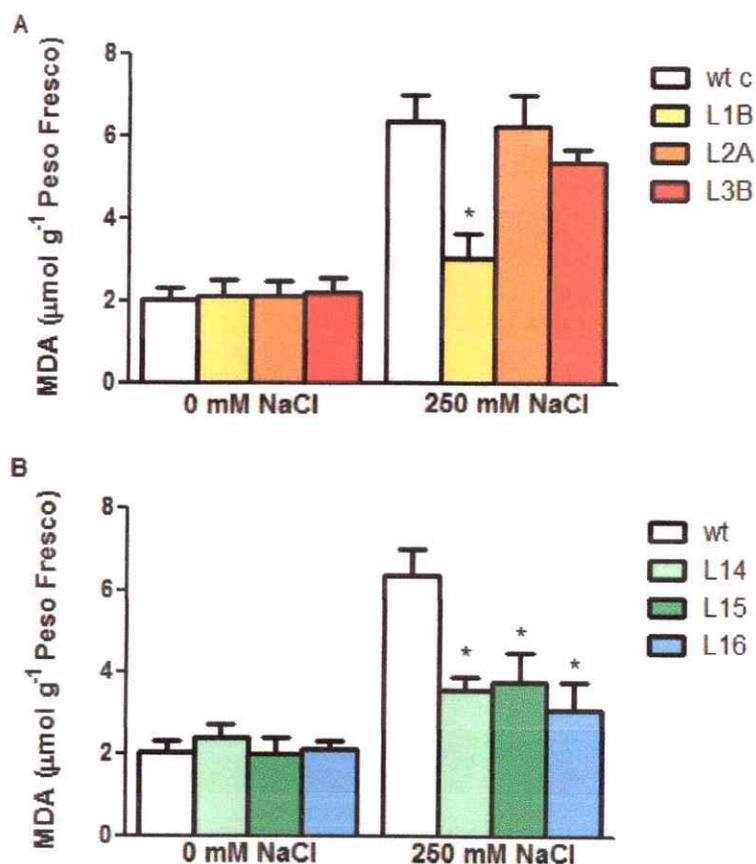
Una de las funciones de los carotenoides en las plantas está relacionada con la limpieza de EROS (Du y col., 2001), las cuales son producidas en plantas por efecto del daño generado por estrés salino, entre otros factores de estrés. Con el fin de

dilucidar si un aumento en el contenido de carotenoides es capaz de conferir tolerancia a estrés salino en las plantas de tabaco *pGWB2/DcPsy1* y *pGWB2/DcLcyb1*, se llevaron a cabo experimentos para cuantificar el daño producido por tratamientos de estrés salino en las plantas de tabaco mediante la cuantificación de malondialdeído (MDA), Fuga Electrolítica Relativa desde las membranas post tratamiento salino agudo y ensayos de peso fresco post tratamiento salino crónico.

#### **3.4.1 Ensayo de peroxidación lipídica en plantas *pGWB2/DcPsy1* y *pGWB2/DcLcyb1* bajo estrés salino**

La susceptibilidad a la peroxidación lipídica de las membranas es otra medida de tolerancia de plantas a estrés ambiental/abiótico y fue determinada mediante la cuantificación del contenido de malondialdeído (MDA), luego de un tratamiento de estrés salino. Para ello discos de hoja de plantas de tabaco wt y de las líneas transgénicas fueron inmersos en una solución de 250 mM NaCl o en la condición control, sin NaCl (**Materiales y Métodos 2.8**). Como se muestra en la **Figura 8A**, no hubo diferencias significativas en el contenido de MDA entre los discos de hoja wt y las líneas transgénicas bajo condiciones de tratamiento control. Luego de la aplicación del tratamiento de estrés salino, la línea transgénica 1B mostró un menor contenido de MDA, el cual fue significativo comparado con el control wt luego de tres días de tratamiento y se condice con la mayor cantidad de carotenoides que muestra esta línea, mientras que las líneas 2A y 3B muestran un mayor contenido de este compuesto sin encontrarse diferencias significativas respecto al control sin transformar wt. Por otro lado, en el caso de las líneas transgénicas *pGWB2/DcLcyb1* 14, 15 y 16, (**Figura 8B**) todas ellas mostraron un menor contenido de MDA comparado con el control wt luego de 3 días de tratamiento en condiciones de estrés salino, datos que

muestran una clara correlación con el contenido de carotenoides totales y específicos que presentan estas líneas.



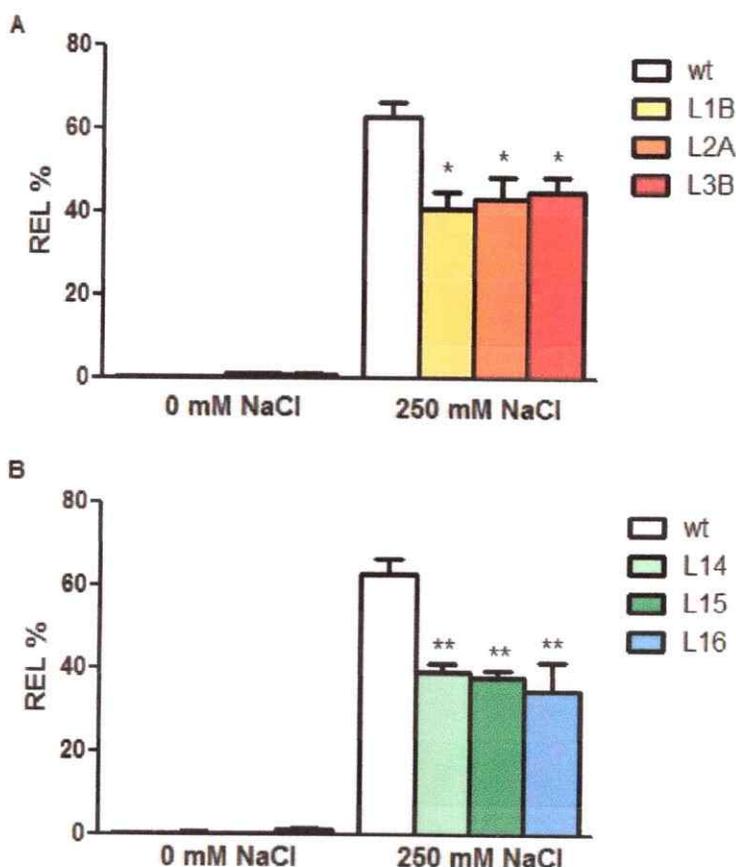
**Figura 8. Medición del contenido de MDA en líneas transgénicas. (A)** Contenido de MDA para líneas pGWB2/DcPsy1 y el control wt **(B)** Contenido de MDA para líneas pGWB2/DcLcyb1 y el control wt. Las mediciones fueron realizadas en discos de hoja de plantas de tabaco de 3 meses infiltrados con una solución de 250 mM NaCl (condición NaCl), luego de 3 días de tratamiento. La condición control corresponde a discos de hoja sin tratamiento. Los asteriscos indican diferencias significativas existentes entre cada línea con el control wt con tratamiento de estrés salino (NaCl). Estas diferencias se determinaron por un test ANDEVA de una vía y un post test de Dunnet, \* p<0.05. Control: sin tratamiento de estrés salino, NaCl: tratamiento de estrés salino 250 mMNaCl, wt: planta de tabaco silvestre, ns: no significativo.

### 3.4.2 Ensayo de fuga electrolítica en plantas pGWB2/DcPsy1 y DcLcyb1 bajo estrés salino agudo

Para profundizar el análisis de la tolerancia a estrés abiótico conferida por el efecto de la acumulación de pigmentos carotenoides, se realizó el ensayo de fuga electrolítica para evaluar la respuesta de las líneas transgénicas estudiadas luego de un estrés salino agudo en plántulas de tabaco T<sub>1</sub> de 17 días. Este ensayo se llevó a cabo en triplicado biológico, donde cada réplica constaba de un *pool* de 5 plantas, para cada línea y el control wt. La técnica se estandarizó utilizando el control wt y la línea pGWB2/DcLcyb1 L16, realizando mediciones a las 3, 6, 9, 12, 24 y 48 hrs luego de un tratamiento en NaCl 250 mM. Los datos fueron tomados a los 0, 10, 20, 30 y 40 minutos post traspaso desde el medio salino a vasos precipitados que contenían agua desionizada (Materiales y Métodos 2.5). Luego de realizar esta estandarización, se decidió considerar, para efectos de este trabajo, el tratamiento de las 12 horas en NaCl 250 mM y la medición a los 40 minutos en agua desionizada, post traspaso de las plántulas desde la solución salina, dado que se observaba la mayor diferencia entre L16 y wt (Datos no mostrados).

Como se observa en la Figura 9, en condiciones control, no se observaron diferencias significativas entre las líneas transgénicas evaluadas y el control wt, indicando que los valores obtenidos de este experimento se deben al efecto del tratamiento de estrés aplicado en estas plántulas. Por otro lado, tanto las líneas pGWB2/DcPsy1 como las líneas pGWB2/DcLcyb1 mostraron un menor porcentaje de pérdida de electrolitos que alcanza valores del 40% en promedio, poniendo en evidencia que el estrés aplicado genera un efecto en las plántulas transgénicas, sin embargo, esta pérdida de electrolitos es menor que la observada en plántulas wt, la

cual alcanza un valor por sobre el 60% de fuga electrolítica. En el caso de las líneas 14, 15 y 16, existe una clara correlación entre el contenido de carotenoides y los resultados que muestra este experimento. Sin embargo, se observa que para las plantas transformadas con el gen *DcPsy1*, el aumento en el nivel de carotenoides se condice con una menor pérdida de electrolitos sólo en el caso de la línea 1B y 3B, mientras que la líneas 2A muestra un porcentaje significativamente menor de pérdida de electrolitos sin ser una línea que muestre un mayor contenido de carotenoides.



**Figura 9. Pérdida de electrolitos en líneas transgénicas. (A)** Porcentaje de pérdida de electrolitos para líneas pGWB2/*DcPsy1* y el control wt **(B)** Porcentaje de pérdida de electrolitos para líneas pGWB2/*DcLcyb1* y el control wt. Los experimentos se llevaron a cabo en 3 réplicas biológicas, cada una compuesta por un grupo de 5 plántulas de tabaco de 17 días. El gráfico muestra la condición control sin tratamiento y NaCl (tratamiento de estrés salino 250 mM NaCl por 12 hrs). Los asteriscos indican diferencias significativas existentes entre cada línea con el

control wt con tratamiento de estrés salino. Estas diferencias se determinaron por un test ANDEVA de una vía y un post test de Dunnet, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  wt: planta de tabaco silvestre, ns: no significativo.

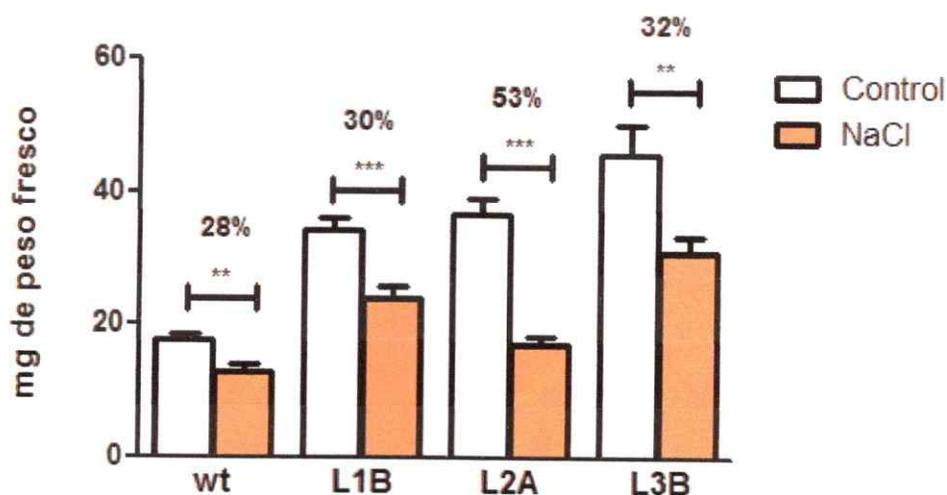
### **3.4.3 Evaluación de la tolerancia a estrés salino crónico de plantas transformadas con el gen *DcPsy1* y *DcLcyb1***

Con el fin de profundizar y dar una respuesta a los resultados obtenidos en el experimento anterior, en donde la mayoría de las líneas presentan una correlación entre su contenido de carotenoides y la tolerancia al tratamiento de estrés aplicado salvo la línea 2A, se decidió evaluar la tolerancia a un estrés salino crónico en plantas de tabaco T<sub>1</sub> de 17 días. Las plántulas fueron sembradas en un total de 30 semillas por línea y control sin transformar wt, y se crecieron durante 13 días en condiciones *in vitro*, en medio MS sin sacarosa y en presencia del antibiótico de selección kanamicina en el caso de las plántulas transgénicas, mientras que el control wt fue cultivado en MS sin sacarosa en ausencia del antibiótico. Al finalizar los 13 días, un grupo de 15 plántulas, por línea y control wt, fue traspasado a un medio MS sin sacarosa, suplementado con NaCl 250 mM (condición llamada NaCl) y el grupo restante de 15 plántulas fue traspasado a un medio fresco MS sin sacarosa sin NaCl (control) (Materiales y Métodos 2.6). Todas las plantas (tanto condición control como NaCl), fueron crecidas durante 16 días en condiciones *in vitro*. Se determinó el peso fresco de las plántulas T<sub>1</sub> de las líneas pGWB2/*DcPsy1* 1B, 2A, 3B y las líneas pGWB2/*DcLcyb1* 14, 15 y 16, además del control sin transformar (wt), al finalizar los 16 días de tratamiento.

### **3.4.3.1 Tolerancia a estrés salino crónico de plantas transformadas con el gen *DcPsy1***

En condiciones normales de cultivo, el peso fresco de plántulas wt control (sin tratamiento salino) llegó a ser, en promedio, 17,74 mg luego de 29 días de crecimiento (Figura 10). Para la línea 2A control, este valor alcanzó un promedio de 36,63 mg, diferencia que fue estadísticamente significativa. En las plántulas de las líneas L1B y L3B control, este promedio llegó a los 34,19 mg y 45,78 mg, respectivamente, mostrando diferencias estadísticamente significativas en cuanto al peso fresco de estas dos líneas comparado con el control wt (Figura 12 Anexa).

Por otro lado, luego de 16 días de tratamiento con NaCl se observó que las plantas wt experimentan una disminución en su peso fresco, alcanzando un promedio de 12,8 mg, el cual corresponde a un 28% de disminución respecto a su condición control. Para el caso de las líneas transgénicas, este valor llega a 24,06 mg (L1B), 17,11 (L2A), y 31,09 mg (L3B), correspondiendo a un 30%, 53% y 32%, respectivamente, indicando la susceptibilidad de las líneas transgénicas a un tratamiento de estrés salino crónico. Tanto para las plántulas wt como para las líneas 1B, 2A y 3B, los datos indicaron que existen diferencias significativas entre la condición control y el tratamiento NaCl de cada una de ellas, indicando que el tratamiento de estrés aplicado generó un efecto negativo en la biomasa de las plántulas.

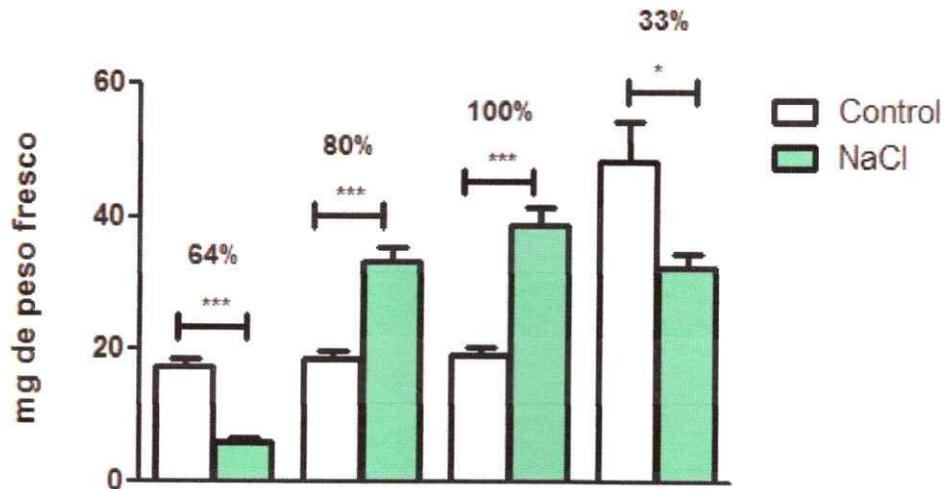


**Figura 10. Determinación del peso fresco de plántulas transgénicas sujetas a tratamiento con NaCl *in vitro*.** El peso fresco de las plántulas transgénicas T<sub>1</sub> de las líneas pGWB2/*DcPsy1* fue determinado en plántulas de 29 días, luego de 16 días de crecimiento en condición control o en condición NaCl 250 mM. Se indica en porcentaje la disminución en peso fresco para aquellas líneas que así lo experimentaron. Los asteriscos indican diferencias significativas comparando cada control y su tratamiento. Estas diferencias se determinaron por un test de T de dos colas, no pareado. \*\*: p<0.01; \*\*\* p<0.001 wt: planta de tabaco silvestre, ns: no significativo.

#### 3.4.3.2 Tolerancia a estrés salino crónico de plantas transformadas con el gen *DcLcyb1*

En plántulas crecidas bajo condiciones control, solo las plántulas correspondientes a la L16 mostraron diferencias significativas en su peso fresco al comparar con plántulas wt y las líneas 14 y 15, alcanzando un promedio de 48 mg en la condición control medida a los 29 días (**Figura 13 Anexa**). En relación al tratamiento de estrés salino aplicado (condición NaCl), tanto las plántulas wt como la L16 experimentaron una disminución en su peso fresco, siendo ésta más drástica en el grupo de plántulas wt, las cuales experimentaron una disminución del 64% en su peso fresco producto del estrés salino aplicado (**Figura 11**). La línea 16, por su parte, disminuyó en un 33%. Cabe destacar que las líneas 14 y 15 mostraron un incremento

del 80 y 100% en su peso fresco, respectivamente, luego de ser sometidas a condiciones de estrés salino con NaCl 250 mM.



**Figura 11.** Determinación del peso fresco de plántulas transgénicas sujetas a tratamiento con NaCl *in vitro*. El peso fresco de las plántulas transgénicas T<sub>1</sub> de las líneas pGWB2/DcLcyb1 fue determinado en plántulas de 29 días, luego de 16 días de crecimiento en condición control o en NaCl 250 mM. Se indica en porcentaje la disminución en peso fresco para aquellas líneas que así lo experimentaron. Los asteriscos indican diferencias significativas comparando cada control y su tratamiento. Estas diferencias se determinaron por un test de T de dos colas, no pareado. \* p<0.05, \*\* p< 0,01 \*\*\* p<0.001 wt: planta de tabaco silvestre, ns: no significativo.

## 4 DISCUSIÓN

### 4.1 Determinación de la expresión de los genes *DcPsy1* y *DcLcyb1* en plantas transgénicas de *N. tabacum* y su participación en la síntesis de carotenoides

Con el fin de determinar el nivel de transcritos de los transgenes *DcPsy1* y *DcLcyb1*, se evaluó la expresión relativa de estos en las líneas T<sub>1</sub> de *N. tabacum* para corroborar que expresaran el transgen, al igual que las líneas parentales T<sub>0</sub> de donde provienen y así luego establecer una relación entre el nivel de transcritos de cada gen y el contenido de carotenoides y clorofilas.

#### 4.1.1 Las líneas transgénicas de *N. tabacum* que expresan el gen *DcPsy1* presentan una expresión diferencial del transgen, como también una acumulación diferencial de carotenoides.

Los resultados indicaron que el gen *DcPsy1* se expresó de forma diferencial entre las líneas evaluadas, observándose que solo una línea acumuló un alto contenido de transcritos del gen, mientras que otra mostró nivel intermedio y la línea L1B presentó un bajo nivel de expresión relativa (Figura 1). Esto podría atribuirse al método de transformación utilizado, ya que mediante la transformación con *A. tumefaciens*, la inserción del transgen en el genoma vegetal ocurre de forma azarosa lo cual podría conducir, en ciertos casos, a una inserción en regiones de heterocromatina con baja tasa de transcripción. Así, la expresión de genes de interés puede atribuirse al lugar de inserción en el genoma de la planta (Gelvin y col., 2007)

En cuanto al contenido de carotenoides, los resultados indican que existe una acumulación diferencial de carotenoides totales,  $\beta$ -caroteno y luteína en las líneas

transgénicas para *DcPsy1*. Sólo la línea 1B, la que presentó el nivel más bajo de abundancia de transcrito, mostró un incremento en su contenido de carotenoides totales y específicos, mientras que la línea 3B experimentó un incremento en los carotenoides totales y  $\beta$ -caroteno, pero solo mostró una tendencia al aumento en cuanto a la luteína. En contraste, la línea 2A, que fue aquella que mostró la mayor acumulación de transcritos, mostró una inalteración en su contenido de carotenoides totales y específicos. Estos resultados se condicen con lo reportado por otros autores (Busch y col., 2002) en donde se obtuvo líneas transgénicas de *N. tabacum* que experimentaron una reducción significativa de algunos carotenoides totales a pesar de mostrar una expresión aumentada del gen *NtPsy1*, como también otros estudios en el modelo vegetal *A. thaliana* indican que la expresión constitutiva de *AtPsy1* no conduce a un aumento en el contenido de carotenoides en hojas (Mass y col., 2009). Antecedentes previos de nuestro grupo de laboratorio indican que se observó la misma tendencia en la generación T<sub>0</sub> de donde provienen estas plantas, en donde se concluyó que los niveles de carotenoides están inversamente relacionados con los niveles de transcrito de este gen y que la sobre-expresión de *DcPsy1* afectaría el desarrollo de las plantas de tabaco (Acevedo, 2011). De acuerdo a lo anteriormente expuesto, podemos concluir de lo observado en la línea 1B y la línea 2A que el nivel de acumulación de transcritos de *DcPsy1* en plantas de tabaco se encuentra inversamente relacionado con la cantidad de carotenoides registrados, ya que una menor acumulación de transcritos del transgen conllevó a un aumento en el contenido de carotenoides totales como específicos, sin embargo, la mayor acumulación de transcritos observada en la L2A no generó un cambio en el contenido de estos pigmentos, manteniendo inalterado los niveles. Estos resultados contrastan con lo observado en plantas de tabaco que

expresan el gen *DcPsy2*, donde las líneas con mayores niveles de carotenoides totales mostraron un alto nivel de expresión del transgen (Acevedo, 2013).

#### **4.1.2 La expresión del gen *DcLcyb1* causa un aumento en los niveles de carotenoides en plantas de tabaco**

Luego de corroborar que las líneas transgénicas 14, 15 y 16 expresaran el gen *Lcyb1* de *D. carota*, se evaluó el contenido de carotenoides de cada línea, encontrando que éstas presentaron un aumento significativo en carotenoides totales y específicos (tanto  $\beta$ -caroteno como luteína) (Figura 2). En general, se observó que el efecto de la expresión del gen *DcLcyb1* condujo a un aumento en el nivel de carotenoides de forma homogénea entre las líneas analizadas, a pesar de observarse una tendencia más marcada al aumento en la L16, ésta fue significativa sólo al comparar el contenido de  $\beta$ -caroteno con la línea 15. Estos resultados se condicen con antecedentes previos de nuestro laboratorio, en donde el grupo de líneas transgénicas para pGWB2/*DcLcyb1* mostró una tendencia general al aumento en los niveles de carotenoides, lo cual se correlacionó con los niveles de expresión del transgen presentados por estas líneas en la generación  $T_0$ . Estos resultados concuerdan con lo obtenido por otros autores, donde la sobreexpresión de genes *Lcyb* y la combinación de este gen con otros genes carotenogénicos se ha correlacionado con un aumento del contenido de carotenoides totales (Diretto y col., 2007; Ahn y col., 2012, Guo y col., 2012)

Los carotenoides, sintetizados en el cloroplasto, comparten precursores comunes con otras rutas biosintéticas de compuestos isoprenoides cuya síntesis tiene lugar en el mismo organelo. Entre ellas se encuentran las plastoquinonas (PQ), la cadena de fitol de las clorofilas, filoquinonas, tocoferoles y el ácido giberélico (GA)

(Meier y col., 2011). Con el fin de determinar el efecto de la expresión heteróloga de los genes *DcPsy1* y *DcLcyb1* en el sistema vegetal *N. tabacum* y considerando antecedentes previos que indican que la expresión constitutiva de genes de *D. carota* en este modelo es capaz de modular la expresión de algunos genes carotenogénicos endógenos (Moreno, 2011), se procedió a analizar la expresión de genes endógenos claves en la síntesis de pigmentos carotenoides (*NtPsy1*, *NtPsy2*, *NtLcyb1*) y de clorofila (*NtChl*).

En el caso de las plantas transformadas con el gen *DcPsy1*, se observó que sólo la línea que acumuló mayor contenido de carotenoides (Figura 5) mostró una clara tendencia al aumento en el nivel de transcritos de los genes carotenogénicos endógenos analizados. A su vez, esta línea presentó los menores niveles de transcritos del transgen, por lo que el aumento en el contenido de carotenoides totales y específicos observado podría estar dado por la inducción de los genes carotenogénicos endógenos analizados y no por efecto único del transgen. Cabe mencionar que este aumento en el nivel de transcritos de los genes endógenos es producto de una modulación de la ruta de biosíntesis de carotenoides dada por la expresión constitutiva del gen *Psy1* de *D. carota*, lo cual se condice con reportes previos de nuestro grupo de laboratorio (Moreno, 2011). Estos resultados contrastan con lo observado en plantas de tabaco que expresan el gen *DcPsy2* en donde las líneas que presentaron mayor contenido de carotenoides mostraban una disminución significativa en la expresión de los transcritos endógenos de *Psy*, demostrando la funcionalidad de este transgen al ejercer un efecto directo en el aumento de carotenoides a través de su expresión (Acevedo, 2013). Sumado a esto, las líneas *Psy2* con un mayor contenido de  $\beta$ -caroteno, presentaron niveles menores o

inalterados del gen *NtLcyb1*, el cual tiene directa relación en la síntesis de este compuesto, indicando que la expresión constitutiva de *DcPsy2* es suficiente para aumentar el contenido de este pigmento (Acevedo, 2013).

Las plantas T<sub>1</sub> transformadas con el gen *DcLcyb1* mostraron una inducción de los tres genes carotenogénicos endógenos analizados (Figura 6), resultados que confirman lo observado en la generación T<sub>0</sub> y sugiere la existencia de un mecanismo de regulación positiva en los genes carotenogénicos *NtPsy* y *NtLcyb* mediada por la expresión heteróloga de *DcLcyb1*. En todas las líneas analizadas (14, 15 Y 16), se observó un aumento en el contenido de carotenoides totales y específicos (Figura 4), lo cual podría ser explicado por el efecto directo del transgen y por una modulación transcripcional de genes carotenogénicos producida por éste, lo cual, en conjunto, lleva a un incremento en el contenido de carotenoides totales y específicos.

#### **4.2 Las líneas transgénicas de *N. tabacum* que expresan el gen *DcPsy1* y *DcLcyb1* poseen un incremento en el contenido de clorofila**

Tomando en consideración la estrecha coordinación existente entre los niveles de carotenoides y clorofila en el tejido fotosintéticos, y ya que comparten al GGPP como precursor común, se evaluó el contenido de clorofila en las líneas transgénicas, encontrándose un aumento en el contenido de clorofilas totales en todas las líneas analizadas (Figura 3 y 4). Esto podría estar dando cuenta de una coordinación entre la síntesis de ambos pigmentos, con el fin de asegurar el correcto desarrollo de la planta (Toledo- Ortiz y col., 2010). Cabe recordar que tanto la clorofila como los carotenoides cumplen un rol fundamental en el ensamblaje de los complejos captadores de luz y, por separado, ambos pigmentos son partícipes del proceso de absorción de energía

lumínica para derivar a la fotoquímica (clorofilas), como de la disipación del exceso de esta energía en forma de calor y emisión de la fluorescencia, en el caso de los carotenoides y clorofila, respectivamente.

Por otro lado, para responder el aumento en el contenido de clorofilas totales en todas las líneas transgénicas evaluadas en este trabajo y considerando la estrecha relación funcional con los carotenoides, se incluyó en este análisis el gen codificante para la clorofila sintasa (*Chl*). Se observó un aumento en el nivel de transcritos de este gen para todas las líneas analizadas, dando cuenta de esta coordinación en la síntesis de ambos pigmentos. Estos resultados se condicen con lo reportado por nuestro grupo de investigación al sobre expresar el gen *lcyb1* en tabaco (Moreno y col., 2013; Cerda, 2015).

#### **4.3 Las líneas de tabaco que expresan el gen *DcPsy1* y *DcLcyb1* presentan un aumento en la eficiencia del PSII**

En plantas superiores, los carotenoides y las clorofilas están unidas a proteínas específicas, cumpliendo un rol estructural fundamental en el ensamblaje de los complejos cosechadores de luz de los fotosistemas I y II (Härtel y Grimm 1998). Por una parte, el  $\beta$ -caroteno se encuentra, principalmente, en los centros de reacción de ambos fotosistemas, mientras que las xantofilas, como luteína, se unen a los complejos cosechadores de luz (Thayer y Björkman, 1992; Bassi y col., 1993; Ruban y col., 1994; Lee y Thomber, 1995). Por este motivo, el aumento en el contenido de carotenoides tanto en las líneas que expresan el gen *DcPsy1* como aquellas que expresan el gen *DcLcyb1*, podría estar asociado a un aumento en el rendimiento fotosintético del PSII.

En el proceso de la fotosíntesis, parte de la energía absorbida es transferida como energía de excitación y luego en el centro de reacción es utilizada para la reacción fotoquímica. El resto de la energía, la cual está en exceso, es disipada principalmente como calor y, en menor grado, es re-emitida como fluorescencia. Son diversos los factores que afectan el funcionamiento del PSII, lo cual generará cambios en la fluorescencia de la clorofila, motivo por el cual el índice de  $F_v/F_m$  ha sido un parámetro tradicionalmente utilizado como indicador de estrés en plantas (Krause y Weis, 1991; Larcher, 2003).

En las plantas de tabaco en condición control (sin estrés lumínico) (**Figura 7**), los valores de  $F_v/F_m$  son fisiológicamente normales según se ha reportado en otros estudios (Krause, 1988; Krause y Weis, 1984, 1991; Rizza y col., 2001). Luego de aplicar el tratamiento de estrés lumínico, se observó una fotoinhibición en todas las líneas analizadas, sin embargo, estos valores no bajaron tan drásticamente como lo hizo el control sin transformar wt. El fenómeno de la fotoinhibición, el cual se traduce en una alteración de la actividad fotosintética gatillada por un exceso de luz, puede dividirse en dos clases según el tiempo de recuperación de la planta para salir de este estado. Una fotoinhibición dinámica es aquella en que la planta es capaz de re distribuir el exceso de energía mediante mecanismos de disipación de ésta, en forma de calor (ciclo de las xantofilas), mediante la reacción de Mehler, fotorespiración, entre otros. Esto indica que la planta se ve afectada por el exceso de energía lumínica, pero posee los mecanismos para trabajar en la fotoprotección de su fotosistema y así, restablecer en cortos períodos de tiempo su equilibrio. Por otro lado, valores de  $F_v/F_m$  bajos, indicarían que los mecanismos de fotoprotección no fueron suficientes y estas plantas necesitan de un período prolongado de recuperación tras el tratamiento de

estrés lumínico, como también indica que existe un daño del aparato fotosintético (Osmond, 1994). En concordancia con lo anteriormente expuesto, se observó que todas las líneas transgénicas mostraron valores de  $F_v/F_m$  significativamente mayores al comparar con el control wt y éste, por su parte, mostró una fotoinhibición de tipo crónica, mientras que las líneas transgénicas muestran una fotoinhibición de tipo dinámica.

La energía lumínica absorbida por la clorofila en las hojas es utilizada como energía fotoquímica, desencadenando la fotosíntesis. El exceso restante, es disipado como calor o puede ser re-emitido como luz, lo cual se conoce como fluorescencia de la clorofila. Estos procesos ocurren en competencia, por lo que el incremento en uno de ellos resulta en la disminución en el rendimiento de los otros dos. De acuerdo a los resultados obtenidos y correlacionando esta respuesta con el contenido de carotenoides y clorofila, se sugiere que todas las líneas analizadas presentan los mecanismos suficientes para llevar a cabo la fotoprotección de su aparato fotosintético ya que al acumular mayor contenido de carotenoides totales y específicos (según corresponde), otros mecanismos de disipación podrían estar siendo potenciados, como también una mayor eficiencia en el uso de la energía lumínica para los procesos fotoquímicos. Cabe destacar que es necesario medir otros parámetros, fotoquímicos y no fotoquímicos, para dilucidar con mayor exactitud la respuesta que se observa en las líneas analizadas frente al tratamiento de estrés aplicado. Sin embargo, los resultados obtenidos nos aportan información valiosa para responder la hipótesis planteada en este trabajo.

#### 4.4 Existe una relación entre el contenido de carotenoides y la defensa contra estrés oxidativo en las líneas transgénicas analizadas

El estrés salino es uno de los factores ambientales más limitante en cuanto a la productividad y distribución de los cultivos en el mundo (Tuteja, 2007). Este tipo de estrés genera efectos negativos en la planta, exponiéndola a estrés osmótico, toxicidad iónica y estrés oxidativo, lo cual conlleva a la producción de especies reactivas de oxígeno (Zhu, 2002).

La susceptibilidad a la lipoperoxidación de membrana, fenómeno que se presenta producto del daño oxidativo en la membrana de las células expuestas a estrés, fue determinada mediante el análisis del contenido de malondialdehído (MDA) en plantas bajo un tratamiento de estrés salino (**Materiales y Métodos 2.8**). Las líneas transgénicas portadoras del gen *DcPsy1* mostraron una respuesta variable en cuanto al contenido de MDA luego de un tratamiento de estrés (**Figura 8**). Sólo la línea 1B mostró un menor contenido de este compuesto, lo cual se condice con su mayor acumulación de carotenoides. En el caso de las líneas que expresan el gen *DcLcyb1*, todas mostraron un menor contenido de MDA comparado con el control wt (**Figura 8**). Los resultados indican que existe una relación entre el contenido de carotenoides y la tolerancia a estrés oxidativo medida, indirectamente, mediante la formación de MDA como producto de la peroxidación lipídica de las membranas celulares, indicando que existe un mecanismo de eliminación del daño oxidativo generado por el estrés salino en las plantas transgénicas que acumulan mayor contenido de carotenoides. Existen evidencias que sugieren que la resistencia al estrés oxidativo puede estar en parte relacionado con la tolerancia al estrés salino (Mittova y col., 2002; Badawi y col., 2004),

mientras que los carotenoides pueden funcionar directamente como compuestos antioxidantes, eliminando el exceso de EROS (Krinsky, 1989).

Una exposición prolongada al estrés salino conlleva a la producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales son una fuente de reacciones tóxicas para la célula, como lo son la peroxidación lipídica, degradación de proteínas y mutaciones en el ADN (Price y Handry, 1991; Vinocur y Altman, 2005; Pitzschke y col., 2006). La peroxidación lipídica, en membranas celulares y de organelos, se produce cuando los niveles de EROS alcanzan concentraciones sobre un umbral, afectando no solo el funcionamiento normal de la célula, si no también agravando el estrés oxidativo mediante la producción de radicales derivados de los lípidos (Montillet y col., 2005). El malondialdehído, resulta ser un indicador del daño oxidativo y, en conjunto con la estabilidad de las membranas, pueden ser utilizados para diferenciar entre tolerancia y sensibilidad al estrés salino (Meloni col., 2003). Por este motivo resulta interesante lo observado en las líneas transgénicas *DcLcyb1* las cuales muestran una respuesta homogénea en cuanto a la tolerancia al estrés salino, siendo posible sugerir que la mayor acumulación de carotenoides totales y específicos en estas líneas conlleva a una mejor respuesta de prevención frente al daño oxidativo, resultados que concuerdan con lo reportado por Chen y col. (2011) en donde la expresión heteróloga del gen *Lcyb* de la especie halófila *Salicornia europaea* en *A. thaliana*, confirió tolerancia al estrés oxidativo inducida por estrés osmótico y salino, mostrando un menor contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y MDA.

Los resultados obtenidos indican que la mayor eficiencia fotoquímica del PSII y el menor contenido de MDA, detectado en las plantas transgénicas sometidas a estrés salino, están directamente relacionados con el contenido de carotenoides, dado por

efecto de la expresión del transgen, sobre todo *DcLcyb1*, y la modulación que éste ejerce en genes clave de la ruta de biosíntesis de carotenoides y clorofilas, respondiendo así a la hipótesis planteada en este trabajo.

#### **4.5 Las líneas transgénicas muestran una menor fuga electrolítica luego de un tratamiento de estrés salino agudo y menor pérdida de peso fresco luego de un estrés salino crónico**

Para profundizar y dar una respuesta más global en cuanto al escenario en que las plantas transgénicas toleran el estrés salino, como también para relacionar los resultados aquí obtenidos con antecedentes previos de nuestro grupo de laboratorio, se realizaron ensayos en plántulas de 17 días y 1 mes de edad las cuales fueron sujetas a tratamientos de estrés salino agudo y crónico, respectivamente.

Para evaluar la respuesta de las líneas transgénicas estudiadas luego de un estrés salino agudo, plántulas de tabaco T<sub>1</sub> de 17 días fueron tratadas con NaCl 250 mM y, posteriormente, se realizaron mediciones de la fuga de iones desde sus membranas celulares utilizando la técnica de Fuga Electrolítica Relativa (**Materiales y Métodos 2.5**). Los resultados indican que existe un menor porcentaje de fuga de iones en las plantas transgénicas, comparado con las plantas wt en todas las líneas transgénicas analizadas. Estos resultados se condicen con el contenido de carotenoides en las líneas 14, 15 y 16, indicando que sus membranas experimentan un menor daño por efecto del estrés salino aplicado, lo cual se traduce en una menor permeabilidad de éstas. Si bien es cierto, las plantas *Psy1* muestran una correlación evidente en el contenido de carotenoides y su porcentaje de fuga de electrolitos sólo en el caso de la línea 1B y 3B, y no así para la línea 2A, es importante recordar que la medición del contenido de carotenoides se realizó en plantas de 3 meses, mientras que

estos experimentos se llevaron a cabo en plántulas de 17 días, lo cual podría tener un efecto adicional en los resultados obtenidos. Por otro lado, el estrés aplicado fue de tipo agudo, lo cual explica en parte que la L2A muestre resultados que la hacen postular como una línea tolerante, según lo observado en este experimento como también en Fv/Fm, en donde mostró valores de eficiencia similares a las líneas que acumulan mayor contenido de carotenoides. Estos resultados contrastan con lo observado en la determinación del contenido de MDA (tratamiento crónico), en el cual se infiltró la solución salina y el material vegetal se incubó por tres días en ésta, mostrando que las líneas 2A y 3B acumularon un mayor contenido de este compuesto, el cual corresponde a un producto final del estrés oxidativo. Es probable que los resultados observados en los experimentos en que se aplicó un estrés agudo (sea salino o lumínico) estén relacionados con una producción de EROS que genera daño en el sistema vegetal, pero a su vez, actúan como estímulo para desencadenar la cascada de respuestas asociadas a la protección y eliminación de estos compuestos, ya que se debe considerar que las plantas poseen mecanismos basales de respuesta a estrés. Es decir, los resultados observados en estos experimentos podrían no tener relación con el aumento o no en el contenido de carotenoides, pues lo que se está observando es una respuesta basal de las plantas en estudio. Esta señalización depende de la existencia de un equilibrio entre la producción de EROS y los mecanismos de protección que poseen las plantas contra el estrés oxidativo (Gratao y col., 2005). La lipoperoxidación, tanto en membranas celulares como de organelos, tiene lugar cuando los niveles de EROS alcanzados superan un umbral determinado, afectando no solo el funcionamiento celular normal, sino que también agravando el grado de estrés oxidativo mediante la producción de radicales derivados de los lípidos, como el MDA (Montillet y col., 2005). Así, se sugiere que la respuesta observada en

cuanto a la L2A se debe a que los tratamientos de estrés agudo, aplicado a plantas de 17 días, generaron un estrés oxidativo que se mantuvo dentro de un umbral que permitió a las plantas desencadenar una respuesta de eliminación de EROS, mientras que en períodos más prolongados (resultado de plantas de 3 meses), el estrés aplicado sobrepasa este umbral y entonces se genera la respuesta diferencial frente al estrés, dada por la mayor acumulación de carotenoides en las líneas en estudio.

Continuando con la evaluación de la respuesta a estrés salino, plántulas de tabaco de 13 días fueron sometidas durante 16 días a condiciones de estrés salino, constituyendo así una condición crónica que posteriormente fue evaluada (**Materiales y Métodos 2.6**). Los resultados indican que para las líneas *DcPsy1* no existe una correlación entre el contenido de carotenoides y la respuesta frente al estrés de tipo crónico, ya que tanto la L1B como la L3B, las cuales acumulan mayor cantidad de carotenoides, muestran una pérdida en peso fresco más drástica que la observada en el control wt, al comparar la condición control con la condición bajo tratamiento NaCl crónico. Por otro lado, la línea 2A experimentó la pérdida en peso fresco más drástica, lo cual se correlaciona con su baja acumulación de carotenoides. Estos resultados se condicen con lo planteado anteriormente en cuanto a la duración del estrés aplicado, indicando que en períodos más prologados, la línea 2A mostró susceptibilidad frente al daño oxidativo generado por el estrés salino. Antecedentes previos de nuestro grupo indican que plántulas de tabaco que expresan *Psy2*, de igual edad, sometidas al mismo tratamiento, muestran una disminución menos drástica en su peso fresco comparado con plántulas wt bajo las mismas condiciones (Acevedo, 2013). Estos antecedentes, en conjunto con la correlación entre los niveles de transcritos y la acumulación de carotenoides totales y específicos, sugieren que el gen *DcPsy2*

presenta una mayor funcionalidad en cuanto a aumentar el contenido de carotenoides y la generación de una tolerancia frente al estrés salino al compararlo con los resultados obtenidos del análisis del gen *DcPsy1* presentados en este trabajo.

En cuanto a las líneas transgénicas para el gen *DcLcyb1*, sólo se observó una disminución en el peso fresco de la L16, sin embargo, ésta fue menos drástica que la observada en plantas wt sometidas al mismo tratamiento, demostrando que por efecto de la expresión del gen *DcLcyb1*, se produjo una mayor acumulación de carotenoides en esta línea lo cual se traduce en el desarrollo de una tolerancia al tratamiento de estrés salino crónico aplicado. Interesantemente, las líneas 14 y 15 mostraron un aumento en su peso fresco bajo condiciones de estrés salino, indicando que además de tolerar esta condición, su peso fresco presenta un incremento de un 80% en su peso fresco para la L14 y un 100% para la L15. Se ha observado que plantas transformadas con genes que codifican para osmoprotectores han experimentado un aumento en su peso bajo condiciones de estrés salino, respuesta que está dada por el rol importante que cumplen los productos de estos genes en los mecanismos de regulación osmótica bajo estrés salino (Karakas y col., 1997; Kavi y col., 1995; Zhu y col., 1998). Si bien es cierto que los carotenoides cumplen una función antioxidante, la acumulación de EROS influye directamente en el crecimiento de las plantas ya que puede generar un daño generalizado, en desmedro del equilibrio del funcionamiento de la planta. Por este motivo, un aumento en el contenido de carotenoides, producto del efecto global que genera la expresión del gen *DcLcyb1*, podría estar alterando otras rutas metabólicas, beneficiando la respuesta de tolerancia bajo condiciones de estrés en estas plantas.

Tomando en cuenta todos los resultados mostrados en este trabajo, proponemos que la expresión de los genes *DcPsy1* y *DcLcyb1* tienen distintos efectos en la conferencia de una tolerancia al estrés salino, dada por el efecto diferencial en la acumulación de carotenoides, generado por efecto de estos genes, en las plantas de *N. tabacum* transgénicas.

Por un lado, el efecto del gen *DcPsy1* en la acumulación de carotenoides totales y específicos, no se condice con los niveles de expresión del transgen como tampoco genera una respuesta clara frente al desarrollo de una tolerancia al estrés salino. La mejor respuesta de  $F_v/F_m$  puede ser respondida mayoritariamente por el aumento en clorofila que presentan todas las líneas, más que por el aumento en carotenoides. A pesar de mostrar una línea que podría sugerir que una baja expresión del transgen se traduce en una modulación en el nivel de transcritos de genes endógenos clave de la ruta de biosíntesis de carotenoides, generando un aumento en el contenido de estos, la respuesta frente a condiciones de estrés salino crónicas, no muestra el desarrollo de una tolerancia que se correlacione con el nivel de carotenoides obtenido por efecto de la expresión del transgen. Sumado a esto, las otras dos líneas analizadas para este gen, indican que no existe una tendencia clara que pueda explicar el efecto de la expresión de este gen en el incremento del contenido de carotenoides y su posterior función como potenciador de la respuesta al estrés abiótico.

Reportes previos de otros grupos de investigación indican que se ha atribuido el desarrollo de la tolerancia a distintos tipos de estrés abiótico (entre ellos el estrés salino) a genes *Psy* de distintas especies (Han y col., 2008; Li y col., 2008 a y b; Cidade y col., 2012). Los resultados de esta tesis en conjunto con otra de nuestro

grupo de investigación indican que en cuanto a los genes *Psy* de *D. carota*, sería el gen *DcPsy2* y no *DcPsy1*, el que muestra un rol claro en promover el aumento en el contenido de carotenoides y el desarrollo de una tolerancia a estrés salino en plantas de tabaco transgénicas (Acevedo, 2013).

La expresión del gen *DcLcyb1* genera un incremento de carotenoides totales y específicos, por efecto de sí mismo y también debido al efecto modulador en la expresión de genes clave para la síntesis de carotenoides. Antecedentes previos de nuestro grupo indican que la expresión de *DcLcyb1* en plantas de tabaco, genera una inducción de los genes claves de la ruta de biosíntesis de carotenoides, clorofilas y giberelinas lo cual explica un incremento general de parámetros de crecimiento vegetativo y reproductivo de estas plantas (Moreno y col., enviado). Por otro lado, el efecto de la expresión de este gen se ve materializado en el desarrollo de una tolerancia al estrés abiótico, principalmente, estrés salino y oxidativo, dado por un aumento significativo en el contenido de carotenoides de estas plantas. Estos resultados indican que el gen *Lcyb1* de *D. carota* es un excelente candidato para ser usado con fines biotecnológicos en el desarrollo de plantas de cultivo tolerantes al estrés abiótico mediante la manipulación genética.



## 5 CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas de este trabajo son:

1. Las líneas de *N. tabacum* que expresan el gen *DcPsy1* muestran una acumulación diferencial de carotenoides totales y específicos el cual no se correlaciona con los niveles de expresión del transgen y es variable entre las líneas transgénicas analizadas
2. Las líneas de *N. tabacum* que expresan el gen *DcLcyb1* muestran un incremento en el contenido de carotenoides totales y específicos por efecto de sí mismo y también debido al efecto modulador del transgen en la expresión de genes endógenos clave para la síntesis de carotenoides.
3. Las líneas transgénicas *DcPsy1* y *DcLcyb1* muestran un incremento en el contenido de clorofila lo que se correlaciona con un aumento en la expresión del gen codificante para la enzima clorofila sintasa (*Chl*) y un aumento en la eficiencia fotoquímica del fotosistema II
4. El gen *DcPsy1* no confiere tolerancia a los tratamientos de estrés evaluados, dada por la cantidad de carotenoides acumulada por efecto de la expresión del transgen.
5. Las líneas de *N. tabacum* que expresan el gen *DcLcyb1* muestran una tolerancia al estrés salino y alta intensidad luminosa, la cual podría estar dada por el aumento en la cantidad de carotenoides
6. Finalmente, se concluye que la expresión heteróloga de los genes *Psy1* y *Lcyb1* de *Daucus carota* confiere tolerancia a estrés salino, y menor susceptibilidad a alta intensidad lumínica lo cual se correlaciona con un aumento en la cantidad

de carotenoides en las plantas de tabaco que expresan el gen *DcLcyb1* y no en aquellas que expresan *DcPsy1*

## 6 BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, O.** 2011 Evaluación de la funcionalidad de los genes fitoeno sintasa (*Psy1* y *Psy2*) 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.
- Acevedo, O.** 2013 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 para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Ahn M-J, Noh SA, Ha S-H, Back K, Lee SW, Bae JM** (2012) Production of ketocarotenoids in transgenic carrot plants with an enhanced level of  $\beta$ -carotene. *Plant biotechnology reports* 6 (2):133-140
- Ahrazem O, Rubio-Moraga A, López RC, Gómez-Gómez L** (2009) The expression of a chromoplast-specific lycopene beta cyclase gene is involved in the high production of saffron's apocarotenoid precursors. *Journal of experimental botany:erp283*
- Aluru M, Xu Y, Guo R, Wang Z, Li S, White W, Wang K, Rodermel S** (2008) Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. *Journal of experimental Botany* 59 (13):3551-3562
- Badawi GH, Yamauchi Y, Shimada E, Sasaki R, Kawano N, Tanaka K, Tanaka K** (2004) Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts. *Plant Science* 166 (4):919-928
- Bai L, Kim EH, DellaPenna D, Brutnell TP** (2009) Novel lycopene epsilon cyclase activities in maize revealed through perturbation of carotenoid biosynthesis. *The Plant Journal* 59 (4):588-599
- Bang H, Kim S, Leskovar D, King S** (2007) Development of a codominant CAPS marker for allelic selection between canary yellow and red watermelon based on SNP in lycopene  $\beta$ -cyclase (LCYB) gene. *Molecular Breeding* 20 (1):63-72
- Bartley GE, Scolnik P** (1993) cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of PSY2, a second tomato gene encoding phytoene synthase. *Journal of Biological Chemistry* 268 (34):25718-25721
- Bartley GE, Viitanen P, Bacot K, Scolnik P** (1992) A tomato gene expressed during fruit ripening encodes an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. *Journal of Biological Chemistry* 267 (8):5036-5039
- Bassi R, Pineau B, Dainese P, Marquardt J** (1993) Carotenoid-binding proteins of photosystem II. *European Journal of Biochemistry* 212 (2):297-303

- Blas AL, Ming R, Liu Z, Veatch OJ, Paull RE, Moore PH, Yu Q (2010)** Cloning of the papaya chromoplast-specific lycopene  $\beta$ -cyclase, CpCYC-b, controlling fruit flesh color reveals conserved microsynteny and a recombination hot spot. *Plant physiology* 152 (4):2013-2022
- Bone RA, Landrum JT (2010)** Dose-dependent response of serum lutein and macular pigment optical density to supplementation with lutein esters. *Archives of biochemistry and biophysics* 504 (1):50-55
- Botella-Pavía P, Rodríguez-Concepción M (2006)** Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiologia Plantarum* 126 (3):369-381
- Bouvier F, Isner J-C, Dogbo O, Camara B (2005a)** Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants. *Trends in plant science* 10 (4):187-194
- Bouvier F, Rahier A, Camara B (2005b)** Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Progress in lipid research* 44 (6):357-429
- Bramley PM (2002)** Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *Journal of experimental botany* 53 (377):2107-2113
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000)** Responses to abiotic stresses. *Biochemistry and molecular biology of plants* 1158:e1203
- Britton G (1995)** Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal* 9 (15):1551-1558
- Buckner B, San Miguel P, Janick-Buckner D, Bennetzen JL (1996)** The *yl* gene of maize codes for phytoene synthase. *Genetics* 143 (1):479-488
- Busch M, Seuter A, Hain R (2002)** Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology* 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.
- Cazzonelli CI, Pogson BJ (2010)** Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in plant science* 15 (5):266-274
- Cerda, A (2015)**. Caracterización fisiológica y molecular de plantas de *Nicotiana tabacum* que expresan el gen *Lcyb1* de *Daucus carota*. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Cidade LC, de Oliveira TM, Mendes AF, Macedo AF, Floh EI, Gesteira AS, Soares-Filho WS, Costa MG (2012)** Ectopic expression of a fruit phytoene synthase from *Citrus paradisi* Macf. promotes abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. *Molecular biology reports* 39 (12):10201-10209

- Clotault J, Peltier D, Berruyer R, Thomas M, Briard M, Geoffriau E (2008)** Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *Journal of Experimental Botany* 59 (13):3563-3573
- Collins AR (1999)** Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* 21 (3):238-246
- Conti A, Pancaldi S, Fambrini M, Michelotti V, Bonora A, Salvini M, Pugliesi C (2004)** A deficiency at the gene coding for  $\zeta$ -carotene desaturase characterizes the sunflower non dormant-1 mutant. *Plant and cell physiology* 45 (4):445-455
- Crozier A, Kamiya Y, Bishop G, Yokota T (2000)** Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, BB Buchanan, W Grissem, and RL Jones, eds (Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists):850-929
- Cunningham FX (2002)** Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure and Applied Chemistry* 74 (8):1409-1417
- Cunningham FX, Chamovitz D, Misawa N, Gantt E, Hirschberg J (1993)** Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene for lycopene cyclase, the enzyme that catalyzes the biosynthesis of  $\beta$ -carotene. *FEBS letters* 328 (1):130-138
- Cunningham Jr F, Gantt E (1998)** Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology* 49 (1):557-583
- Chang S, Puryear J, Caimery J (1993)** A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant molecular biology reporter* 11 (2):113-116
- Chen H, Zhang J, Neff MM, Hong S-W, Zhang H, Deng X-W, Xiong L (2008)** Integration of light and abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (11):4495-4500
- Chen X, Han H, Jiang P, Nie L, Bao H, Fan P, Lv S, Feng J, Li Y (2011)** Transformation of  $\beta$ -lycopene cyclase genes from *Salicornia europaea* and *Arabidopsis* conferred salt tolerance in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant and cell physiology* 52 (5):909-921
- D'Ambrosio C, Giorio G, Marino I, Merendino A, Petrozza A, Salvi L, Stigliani AL, Cellini F (2004)** Virtually complete conversion of lycopene into  $\beta$ -carotene in fruits of tomato plants transformed with the tomato lycopene  $\beta$ -cyclase (*tlcy-b*) cDNA. *Plant Science* 166 (1):207-214
- Dall'Osto L, Lico C, Alric J, Giuliano G, Havaux M, Bassi R (2006)** Lutein is needed for efficient chlorophyll triplet quenching in the major LHCII antenna complex of higher plants and effective photoprotection in vivo under strong light. *BMC Plant Biology* 6 (1):32
- Demmig-Adams B, Gilmore AM, Adams W (1996)** Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants. *The FASEB Journal* 10 (4):403-412
- Devitt LC, Fanning K, Dietzgen RG, Holton TA (2009)** Isolation and functional characterization of a lycopene  $\beta$ -cyclase gene that controls fruit colour of papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of experimental botany*:erp284

- Dharmapuri S, Rosati C, Pallara P, Aquilani R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G (2002)** Metabolic engineering of xanthophyll content in tomato fruits. *Febs Letters* 519 (1):30-34
- Diretto G, Al-Babili S, Tavazza R, Papacchioli V, Beyer P, 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, Laferrière A, d'Harlingue A, Camara B (1988)** Carotenoid biosynthesis: Isolation and characterization of a bifunctional enzyme catalyzing the synthesis of phytoene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (19):7054-7058
- Dong H, Deng Y, Mu J, Lu Q, Wang Y, Xu Y, Chu C, Chong K, Lu C, Zuo J (2007)** The Arabidopsis Spontaneous Cell Death1 gene, encoding a  $\zeta$ -carotene desaturase essential for carotenoid biosynthesis, is involved in chloroplast development, photoprotection and retrograde signalling. *Cell research* 17 (5):458-470
- Doyle JJ (1987)** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem bull* 19:11-15
- Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A (2001)** Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in plant science* 6 (2):78-84
- Fang J, Chai C, Qian Q, Li C, Tang J, Sun L, Huang Z, Guo X, Sun C, Liu M (2008)** Mutations of genes in synthesis of the carotenoid precursors of ABA lead to pre-harvest sprouting and photo-oxidation in rice. *The Plant Journal* 54 (2):177-189
- Fraser PD, Bramley PM (2004)** The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in lipid research* 43 (3):228-265
- Fraser PD, Römer S, Kiano JW, Shipton CA, Mills PB, Drake R, Schuch W, Bramley PM (2001)** Elevation of carotenoids in tomato by genetic manipulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81 (9):822-827
- Fraser, PD, Truesdale, M. R., Bird, C. R., Schuch, W., & Bramley, PM (1994).** Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development (evidence for tissue-specific gene expression). *Plant Physiology* 105 (1), 405-413
- 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 JC, Handford M, Rodriguez-Concepcion M, Stange C (2012)** Light-dependent changes in plastid differentiation influence carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant molecular biology* 79 (1-2):47-59

- Gelvin SB, Kim S-I (2007)** Effect of chromatin upon *Agrobacterium* T-DNA integration and transgene expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1769 (5):410-421
- Giorio G, Stigliani AL, D'Ambrosio C (2007)** Agronomic performance and transcriptional analysis of carotenoid biosynthesis in fruits of transgenic HighCaro and control tomato lines under field conditions. *Transgenic research* 16 (1):15-28
- Giuliano G, Bartley GE, Scolnik PA (1993)** Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *The Plant Cell* 5 (4):379-387
- Goodwin T (2012)** *The Biochemistry of the Carotenoids: Volume I Plants*, vol 1. Springer Science & Business Media,
- Graifenberg A, Giustiniani L, Barsanti L, Botrini L (2000)** Effects of salt-stress on tomato fruit quality. *Colture Protette* 29 (6):71-80
- Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA (2005)** Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* 32 (6):481-494
- Guo F, Zhou W, Zhang J, Xu Q, Deng X (2012)** Effect of the citrus lycopene  $\beta$ -cyclase transgene on carotenoid metabolism in transgenic tomato fruits. *PLoS one* 7 (2)
- Haake V, Cook D, Riechmann J, Pineda O, Thomashow MF, Zhang JZ (2002)** Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 130 (2):639-648
- Hadley CW, Miller EC, Schwartz SJ, Clinton SK (2002)** Tomatoes, lycopene, and prostate cancer: progress and promise. *Experimental Biology and Medicine* 227 (10):869-880
- Han H, Li Y, Zhou S (2008)** Overexpression of phytoene synthase gene from *Salicornia europaea* alters response to reactive oxygen species under salt stress in transgenic *Arabidopsis*. *Biotechnology letters* 30 (8):1501-1507
- Härtel H, Grimm B (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
- Hirschberg J (2001)** Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current opinion in plant biology* 4 (3):210-218
- Howitt CA, Pogson BJ (2006)** Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell & Environment* 29 (3):435-445
- Huguency, P., Badillo, A., Chen, H. C., Klein, A., Hirschberg, J., Camara, B., & Kuntz, M (1995).** Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annum* chromoplasts. *The Plant Journal*, 8(3), 417-424

- Hunter WN (2007)** The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 282 (30):21573-21577
- Ikoma Y, Komatsu A, Kita M, Ogawa K, Omura M, Yano M, Moriguchi T (2001)** Expression of a phytoene synthase gene and characteristic carotenoid accumulation during citrus fruit development. *Physiologia Plantarum* 111 (2):232-238
- Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O, Thomashow MF (1998)** Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280 (5360):104-106
- Just B, Santos C, Fonseca M, Boiteux L, Oloizia B, Simon P (2007)** Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Theoretical and Applied Genetics* 114 (4):693-704
- Karakas B, Ozias-Akins P, Stushnoff C, Suefferheld M, Rieger M (1997)** Salinity and drought tolerance of mannitol-accumulating transgenic tobacco. *Plant Cell and Environment* 20 (5):609-616
- Karvouni Z, John I, Taylor JE, Watson CF, Turner AJ, Grierson D (1995)** Isolation and characterisation of a melon cDNA clone encoding phytoene synthase. *Plant molecular biology* 27 (6):1153-1162
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999)** Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature biotechnology* 17 (3):287-291
- Kato M, Ikoma Y, Matsumoto H, Sugiura M, Hyodo H, Yano M (2004)** Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiology* 134 (2):824-837
- Kavi Kishor P, ZONGLIE H, Miao G-H, Hu C-A, Verma DPS (1995)** Overexpression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology* 108 (4):1387-1394
- Kim K-N, Cheong YH, Grant JJ, Pandey GK, Luan S (2003a)** CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in Arabidopsis. *The Plant Cell* 15 (2):411-423
- Kim K-N, Lee J-S, Han H, Choi SA, Go SJ, Yoon IS (2003b)** Isolation and characterization of a novel rice Ca<sup>2+</sup>-regulated protein kinase gene involved in responses to diverse signals including cold, light, cytokinins, sugars and salts. *Plant molecular biology* 52 (6):1191-1202
- Kim M-J, Kim JK, Kim HJ, Pak JH, Lee J-H, Kim D-H, Choi HK, Jung HW, Lee J-D, Chung Y-S (2012)** Genetic modification of the soybean to enhance the  $\beta$ -carotene content through seed-specific expression.

- Koyama Y, Rondonuwu FS, Fujii R, Watanabe Y (2004)** Light-harvesting function of carotenoids in photo-synthesis: The roles of the newly found 11B u- state. *Biopolymers* 74 (1-2):2-18
- Krause G, Weis E (1991)** Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual review of plant biology* 42 (1):313-349
- Krause GH (1988)** Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiologia Plantarum* 74 (3):566-574
- Krause GH, Weis E (1984)** Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. *Photosynthesis research* 5 (2):139-157
- Krinsky NI (1989)** Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine* 7 (6):617-635
- Krubasik P, Sandmann G (2000)** Molecular evolution of lycopene cyclases involved in the formation of carotenoids with ionone end groups. *Biochemical Society Transactions* 28 (6):806-809
- Kumar A, Gupta A, Azooz M, Sharma S, Ahmad P, Dames J (2013)** Genetic approaches to improve salinity tolerance in plants. In: *Salt Stress in Plants*. Springer, pp 63-78
- Lange BM, Ghassemian M (2003)** Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant molecular biology* 51 (6):925-948
- Larcher W (2003)** *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer Science & Business Media,
- Lee Al-c, Thomber JP (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 Physiology* 107 (2):565-574
- Leung J, Giraudat J (1998)** Abscisic acid signal transduction. *Annual review of plant biology* 49 (1):199-222
- Li F, Tzfadia O, Wurtzel ET (2009)** The phytoene synthase gene family in the Grasses: subfunctionalization provides tissue-specific control of carotenogenesis. *Plant signaling & behavior* 4 (3):208-211
- Li F, Vallabhaneni R, Wurtzel ET (2008a)** PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant Physiology* 146 (3):1333-1345
- Li F, Vallabhaneni R, Yu J, Rocheford T, Wurtzel ET (2008b)** The maize phytoene synthase gene family: overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. *Plant physiology* 147 (3):1334-1346

- Li L, Lu S, Cosman KM, Earle ED, Garvin DF, O'Neill J (2006)**  $\beta$ -Carotene accumulation induced by the cauliflower Or gene is not due to an increased capacity of biosynthesis. *Phytochemistry* 67 (12):1177-1184
- Lichtenthaler HK (1999)** The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology* 50 (1):47-65
- Lichtenthaler HK, Buschmann C (2001)** Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*
- Lindgren LO, Ståhlberg KG, Höglund 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 physiology* 132 (2):779-785
- Lintig J, Welsch R, Bonk M, Giuliano G, Batschauer A, Kleinig H (1997)** Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *The Plant Journal* 12 (3):625-634
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998)** Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10 (8):1391-1406
- Maass D, Arango J, Wüst F, Beyer P, Welsch R (2009)** Carotenoid crystal formation in *Arabidopsis* and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PLoS One* 4 (7):e6373
- Meier S, Tzfadia O, Vallabhaneni R, Gehring C, Wurtzel ET (2011)** A transcriptional analysis of carotenoid, chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis genes during development and osmotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *BMC systems biology* 5 (1):77
- Meloni DA, Oliva MA, Martinez CA, Cambraia J (2003)** Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 49 (1):69-76
- Milborrow B (2001)** The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 52 (359):1145-1164
- Mittova V, Tal M, Volokita M, Guy M (2002)** Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiologia Plantarum* 115 (3):393-400
- Montillet J-L, Chamnongpol S, Rustérucchi C, Dat J, Van De Cotte B, Agnel J-P, Battesti C, Inzé D, Van Breusegem F, Triantaphylidès C (2005)** Fatty acid hydroperoxides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiology* 138 (3):1516-1526

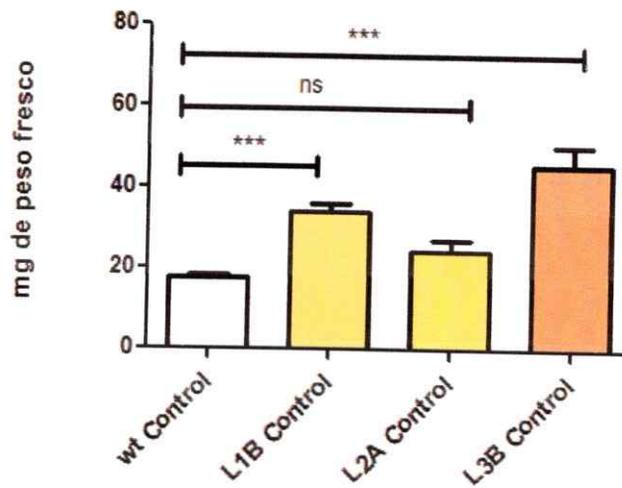
- Moreno J (2012)** Lycopene  $\beta$ -cylase1 gene (*lcyb1*) from *Daucus carota* regulates carotenoid biosynthesis in tobacco and carrot. Tesis de Magister para optar al título de Magister en Ciencias Biológicas. Universidad de Chile, Santiago, Chile
- Moreno JC, Pizarro L, Fuentes P, Handford M, Cifuentes V, Stange C, Moreno J, Fuentes P (2013)** Levels of lycopene  $\beta$ -cyclase 1 modulate carotenoid gene expression and accumulation in *Daucus carota*. PloS one 8 (3):e58144
- Mukhopadhyay A, Vij S, Tyagi AK (2004)** Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101 (16):6309-6314
- Murashige T, Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum 15 (3):473-497
- Nambara E, Marion-Poll A (2005)** Abscisic acid biosynthesis and catabolism. Annu Rev Plant Biol 56:165-185
- Niyogi KK (1999)** Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. Annual review of plant biology 50 (1):333-359
- Osmond C (1994)** What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. Photoinhibition of photosynthesis from molecular mechanisms to the field
- Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, Howells RM, Kennedy MJ, Vernon G, Wright SY, Hinchliffe E, Adams JL, Silverstone AL (2005)** Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. Nature biotechnology 23 (4):482-487
- Pfaffl MW (2001)** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic acids research 29 (9):e45-e45
- Pitzschke A, Hirt H (2006)** Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling in plants. Plant Physiology 141 (2):351-356
- Price A, Hendry G (1991)** Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. Plant, Cell & Environment 14 (5):477-484
- Ritz T, Damjanović A, Schulten K, Zhang J-P, Koyama Y (2000)** Efficient light harvesting through carotenoids. Photosynthesis Research 66 (1-2):125-144
- Rizza F, Pagani D, Stanca A, Cattivelli L (2001)** Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and spring oats. Plant Breeding 120 (5):389-396
- Rock CD, Zeevaart J (1991)** The aba mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences 88 (17):7496-7499

- Rodríguez-Concepción M** (2010) Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. *Archives of biochemistry and biophysics* 504 (1):118-122
- Rodríguez-Concepción M, Stange C** (2013) Biosynthesis of carotenoids in carrot: an underground story comes to light. *Archives of biochemistry and biophysics* 539 (2):110-116
- Rodríguez-Villalón A, Gas E, Rodríguez-Concepción M** (2009) Colors in the dark: a model for the regulation of carotenoid biosynthesis in etioplasts. *Plant signaling & behavior* 4 (10):965-967
- Rodríguez-Villalón A, Gas E, Rodríguez-Concepción M** (2009) Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal* 60 (3):424-435
- Römer S, Fraser PD** (2005) Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. *Planta* 221 (3):305-308
- Römer S, Hugueney P, Bouvier F, Camara B, Kuntz M** (1993) Expression of the genes encoding the early carotenoid biosynthetic-enzymes in *Capsicum annuum*. *Biochemical and biophysical research communications* 196 (3):1414-1421
- Rosati C, Aquilani R, Dharmapuri S, Pallara P, Marusic C, Tavazza R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G** (2000) Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. *The Plant Journal* 24 (3):413-420
- Ruban AV, Young AJ, Pascal AA, Horton P** (1994) The effects of illumination on the xanthophyll composition of the photosystem II light-harvesting complexes of spinach thylakoid membranes. *Plant Physiology* 104 (1):227-234
- Scolnik PA, Bartley GE** (1994) Nucleotide sequence of an *Arabidopsis* cDNA for phytoene synthase. *Plant physiology* 104 (4):1471
- Shewmaker CK, Sheehy JA, Daley M, Colburn S, Ke DY** (1999) Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *The Plant Journal* 20 (4):401-412
- Singh M, Lewis PE, Hardeman K, Bai L, Rose JK, Mazourek M, Chomet P, Brutnell TP** (2003) Activator mutagenesis of the pink scutellum1/viviparous7 locus of maize. *The Plant Cell* 15 (4):874-884
- Skelton RL, Yu Q, Srinivasan R, Manshardt R, Moore PH, Ming R** (2006) Tissue differential expression of lycopene  $\beta$ -cyclase gene in papaya. *Cell research* 16 (8):731-739
- Stange C, Flores C** (2011) Carotenoids and photosynthesis-regulation of carotenoid biosynthesis by photoreceptors. *Advances in photosynthesis-fundamental aspects*:77-96
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A** (2008) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* 54 (4):733-749

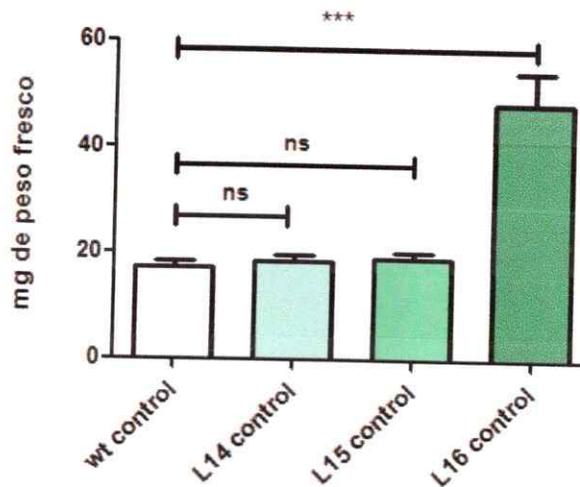
- Thayer SS, Björkman O (1992)** Carotenoid distribution and deepoxidation in thylakoid pigment-protein complexes from cotton leaves and bundle-sheath cells of maize. *Photosynthesis research* 33 (3):213-225
- Toledo-Ortiz G, Huq E, Rodríguez-Concepción M (2010)** Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (25):11626-11631
- Tripathi V, Syed N, Laxmi A, Chattopadhyay D (2009)** Role of CIPK6 in root growth and auxin transport. *Plant signaling & behavior* 4 (7):663-665
- Tuteja N (2007)** Chapter Twenty-Four-Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants. *Methods in enzymology* 428:419-438
- Vinocur B, Altman A (2005)** Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current opinion in biotechnology* 16 (2):123-132
- Walter MH, Strack D (2011)** Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. *Natural product reports* 28 (4):663-692
- Walton DC, Yi L (1995)** Abscisic acid biosynthesis and metabolism. In: *Plant hormones*. Springer, pp 140-157
- Welsch R, Beyer P, Huguency P, Kleinig H, von Lintig J (2000)** Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta* 211 (6):846-854
- Welsch R, Wüst F, Bär C, Al-Babili S, Beyer P (2008)** A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes. *Plant Physiology* 147 (1):367-380
- Yang W, Kong Z, Omo-Ikerodah E, Xu W, Li Q, Xue Y (2008)** Calcineurin B-like interacting protein kinase OsCIPK23 functions in pollination and drought stress responses in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Genetics and Genomics* 35 (9):531-S532
- Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I (2000)** Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287 (5451):303-305
- Yeum K-J, Russell RM (2002)** Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annual Review of Nutrition* 22 (1):483-504
- Yokoi S, Bressan RA, Hasegawa PM (2002)** Salt stress tolerance of plants. *JIRCAS working report* 23 (01):25-33
- Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010)** AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *The Plant Journal* 61 (4):672-685

- Zeevaart J, Creelman R (1988)** Metabolism and physiology of abscisic acid. Annual review of plant physiology and plant molecular biology 39 (1):439-473
- Zhu B, Su J, Chang M, Verma DPS, Fan Y-L, Wu R (1998)** Overexpression of a  $\Delta$  1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water-and salt-stress in transgenic rice. Plant Science 139 (1):41-48
- Zhu J-K (2002)** Salt and drought stress signal transduction in plants. Annual review of plant biology 53:247

## 7 ANEXO



**Figura Anexa 12** Determinación del peso fresco de plántulas transgénicas cultivadas *in vitro*. El peso fresco de las plántulas transgénicas T<sub>1</sub> de las líneas pGWB2/DcPsy1 fue determinado en plántulas de 29 días de crecimiento en medio MS, condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas comparando cada línea con plantas wt. Estas diferencias se determinaron por un test de T de dos colas, no pareado. \*\*: p<0.01; \*\*\* p<0.001, wt: planta de tabaco silvestre, ns: no significativo.



**Figura Anexa 13** Determinación del peso fresco de plántulas transgénicas cultivadas *in vitro*. El peso fresco de las plántulas transgénicas T<sub>1</sub> de las líneas pGWB2/DcLcyb1 fue determinado en plántulas de 29 días de crecimiento en condición control. Los asteriscos indican

diferencias significativas comparando cada línea con plantas wt. Estas diferencias se determinaron por un test de T de dos colas, no pareado. \*\*\*  $p < 0.001$ , Wt: planta de tabaco silvestre, ns: no significativo