

UCH-FC
Biotecnología
P 441
C 1



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO**

**“Diseño y análisis funcional de vectores que permitirán elevar
el contenido de carotenoides en frutos”**

Seminario de Título Entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento
parcial de los requisitos para optar al título de

Ingeniería en Biotecnología Molecular

Clío Andrea Peirano Hernández

Marzo- 2013

Santiago-Chile



Directora del Seminario de Título: Dra. Claudia Stange



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Clío Andrea Peirano Hernández

“Diseño y análisis funcional de vectores que permitirán elevar el contenido de carotenoides en frutos”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular

Dr(a). *Claudia Stange*
Director Seminario de Título

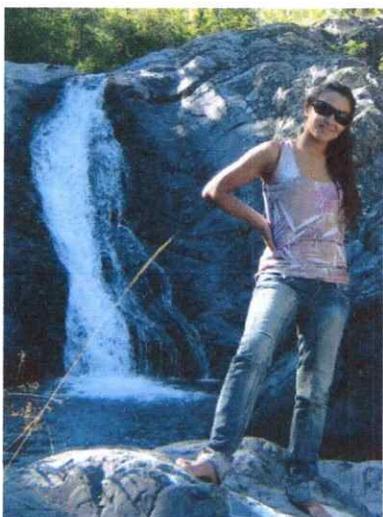
Comisión de Evaluación

Dr(a). *Francisco P. Chávez*
Presidente Comisión

Dr(a). *Michelle Nandefeld*
Evaluador

Santiago, *11 Marzo 2013*

BIOGRAFIA



Mi nombre es Clío Peirano, nací el 15 de Agosto de 1987 en la Ciudad Jardín, luego de lo cual, tras una visita fugaz a Santiago, me mude finalmente a San Fernando, zona huasa en la que residí el resto de mi vida escolar.

Tuve una infancia feliz gracias al cariño de mi familia y a la gran dedicación de mi madre, quien me inculcó los valores esenciales para enfrentar la vida de la forma correcta.

Mi educación básica y media fue en el Instituto San Fernando, lugar que me brindó una buena formación académica así como un gran amor por la gimnasia rítmica. También fue el lugar donde conocí a mis mejores amigas, amistad que sigo manteniendo fielmente hasta el día de hoy, de la cual guardo muchos hermosos recuerdos.

Después de mucho pensar y por mi gran interés en ciencias, decidí estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile, para lo cual tuve que abandonar mi ciudad de origen y venirme a vivir a la capital. Dentro del transcurso de la carrera tuve la oportunidad de irme de intercambio a Barcelona, lo que fue una de las mejores experiencias de mi vida. Al terminar esta etapa quedan en mí las enseñanzas de grandes profesores, así como el recuerdo de muy buenos amigos y los agradables momentos que pasamos juntos.

En este periodo de mi vida también conocí a un gran hombre, que ha demostrado ser un maravilloso compañero de vida a lo largo de los años, con el que he vivido momentos increíbles.

DEDICATORIA

“CAMINA LENTO... NO TE APRESURES, QUE AL UNICO LUGAR QUE TIENES QUE LLEGAR ES A
TI MISMO”

ORTEGA Y GASSET

A mis abuelos, mi hermana y mi madre, quienes siempre me guiaron y me
transformaron en la persona que soy actualmente.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría empezar agradeciendo a todas las personas que trabajan en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile. A mis compañeros de trabajo por las sugerencias, la ayuda y las críticas constructivas, las cuales me ayudaron enormemente a la realización de este seminario, son grandes personas. A los distintos profesores del Laboratorio, los cuales me guiaron y me brindaron sus consejos en más de una ocasión. En especial, quiero agradecer a la profe Claudia, por sus consejos, su ayuda en el diseño experimental y en la parte práctica de este trabajo.

A toda mi familia, cada uno de ellos ocupa un papel fundamental en mi vida, sin ella nada de esto habría sido posible. En especial al gran esfuerzo de mi madre, a la enorme dedicación que nos dio a mí y mi hermana cuando estábamos creciendo, por su enorme paciencia y por siempre creer en mí.

A todos los amigos que conocí en la Universidad, gracias a ustedes mi experiencia universitaria fue mucho más bella. A mis amigos de la vida por apoyarme, escucharme y por estar siempre ahí. Todos estarán siempre en mi corazón.

Finalmente quiero agradecerle a Bernardo, por ser un gran compañero de vida, por su apoyo incondicional, su paciencia, su eterna comprensión y por haberme impulsado siempre a perseguir mis sueños.

INDICE DE CONTENIDO

1. Introducción	1
1.1. Situación país – Exportación de Manzanas en Chile	1
1.2. Mejoramiento de las variedades frutales en Chile	3
1.3. Características de los carotenoides, función y biosíntesis	4
1.4. Manipulación genética de la ruta de síntesis de carotenoides.....	8
1.5. Organismos seleccionados como dadores de los genes carotenogénicos	11
1.6. Expresión de carotenoides de forma fruto específica	14
1.7. Objetivos	16
1.7.1. Objetivo general.....	16
1.7.2. Objetivos específicos	16
2. Materiales y Métodos	17
2.1. Materiales.....	17
2.1.1. Material Biológico	17
2.1.2. Reactivos.....	17
2.2. Cultivos bacterianos y transformaciones	17
2.2.1. Obtención de <i>E.coli</i> , cepa <i>DH5α</i> quimio-competentes.	17
2.2.2. Transformación de <i>E.coli</i> , cepa <i>DH5α</i> quimio-competentes.	18
2.2.3. Obtención de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , cepa GV3101 competente.	19
2.2.4. Transformación de <i>A. tumefaciens</i>	19
2.3. Métodos de Biología Molecular.....	20
2.3.1. Extracción de ADN plasmidial.	20
2.3.2. Cuantificación y visualización del ADN mediante electroforesis.	21
2.3.3. Purificación banda de ADN desde geles de agarosa.....	21
2.3.4. Digestiones enzimáticas.....	22
2.3.5. Diseño de partidores	23
2.3.6. Reacciones de PCR.....	24
2.3.7. Construcciones génicas.....	27
2.3.8. Transformaciones transitorias de frutos.....	35
2.3.9. Extracción, visualización y cuantificación de ARN de frutos.	36

2.4. Microscopía de epifluorescencia.....	39
3. Resultados	40
3.1. Obtención del vector pCP	40
3.2. Obtención de las construcciones génicas pCP: <i>psy2</i> y pCP: <i>psy2:crtI</i>	42
3.2.1. Diseño bioinformático de las construcciones génicas <i>pPG::psy2::nos</i> y <i>pPG::pt:crtI::nos</i>	42
3.2.2. Obtención del vector pCP: <i>psy2</i>	46
3.2.3. Obtención del vector pCP: <i>psy2:crtI</i>	49
3.3. Análisis de la funcionalidad transcripcional de los vectores <i>pCP:psy2</i> y <i>pCP:psy2:crtI</i>	52
3.4. Determinación de la localización subcelular de las proteínas PSY2 de <i>D. carota</i> y PT:: <i>CRTI</i> de <i>X. dendrorhous</i>	54
3.4.1. Localización de la proteína PSY2 de <i>D. carota</i>	54
3.4.2. Localización de la proteína PT:: <i>CRTI</i>	59
4. Discusión	64
5. Conclusiones	81
6. Bibliografía	83
Anexos	92

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Antibióticos usados para la selección de los clones positivos de los vectores generados en este seminario de título.	19
Tabla 2. Lista de enzimas de restricción utilizadas para verificar la presencia y orientación del inserto en los vectores generados en este seminario de título.....	22
Tabla 3. Partidores utilizados durante este seminario de título.....	23
Tabla 4. Programas de PCR utilizados en este seminario de título.....	26
Tabla 5. Análisis bioinformático de la localización subcelular de la proteína PSY2.	58
Tabla 6. Análisis bioinformático de la localización subcelular de la proteína PT::CRTI.	63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de biosíntesis de carotenoides.....	8
Figura 2. Obtención del vector pCP.....	30
Figura 3. Mecanismo de recombinación mediante la tecnología Gateway	35
Figura 4. PCR de colonias del vector pB7FWG2.0- <i>Atdxr</i>	40
Figura 5. Digestión <i>SacI</i> - <i>XbaI</i> del vector pB7FWG2.0- <i>dxr</i> y purificación del fragmento de interés.....	40
Figura 6. Digestión <i>SacI</i> - <i>XbaI</i> del SMC y purificación del fragmento de interés.....	41
Figura 7. PCR del SMC del vector pCP.	41
Figura 8. Digestión del vector pCP con <i>NheI</i> - <i>SpeI</i> y <i>NdeI</i> - <i>XhoI</i>	42
Figura 9. Construcciones génicas que permitirán la expresión fruto específica de los genes <i>psy2</i> de <i>D.carota</i> y <i>crtI</i> de <i>X.dendrorhous</i>	43
Figura 10. Optimización de codones para <i>M. domestica</i> de los genes <i>psy2</i> de <i>D. carota</i> y <i>crtI</i> de <i>X. dendrorhous</i>	44
Figura 11. Predicción de potenciales genes presentes en las construcciones <i>pPG::psy2::nos</i> y <i>pPG::pt::crtI::nos</i>	45
Figura 12. PCR de colonias del gen <i>psy2</i> de <i>D. carota</i> optimizado en pUC57.....	46
Figura 13. Digestión con <i>BamHI</i> del vector pUC57: <i>pPG::psy2::nos</i>	46
Figura 14. Digestión del vector pUC57: <i>pPG::psy2::nos</i> con <i>SpeI</i> y purificación de la banda de interés.....	47
Figura 15. Digestión y purificación del vector pCP con <i>SpeI</i>	47
Figura 16. Digestión del vector pCP: <i>pPG::psy2::nos</i> con <i>HindIII</i>	48
Figura 17. PCR de colonias de <i>Agrobacterium</i> portadoras del vector pCP: <i>psy2</i>	48
Figura 18. PCR de colonias del <i>pt</i> fusionado al gen <i>crtI</i> de <i>X. dendrorhous</i> optimizado en pUC57.	49
Figura 19. Digestión con <i>KpnI</i> del vector pUC57: <i>pPG::pt::crtI::nos</i>	49
Figura 20. Digestión del vector pUC57: <i>pPG::pt::crtI::nos</i> con <i>XhoI</i> y purificación de la banda de interés.....	50
Figura 21. Digestión y purificación del vector pCP: <i>psy2</i> con <i>XhoI</i>	50

Figura 22. Digestión del vector pCP:pPG::psy2::nos-pPG::pt::crtI::nos con <i>BstEII</i> ...	51
Figura 23. PCR de colonias de <i>Agrobacterium</i> portadoras del vector pCP:psy2:crtI	52
Figura 24. Amplificación del gen <i>psy2</i> y <i>18S</i> a partir de muestras de ADNc obtenido de frutos de tomate transformados transitoriamente con el vector PCP:psy2.	53
Figura 25. Amplificación del gen <i>psy2</i> , <i>crtI</i> y <i>18S</i> a partir de muestras de ADNc obtenido de frutos de tomate y manzana transformados transitoriamente con el vector PCP:psy2:crtI.....	54
Figura 26. Amplificación del promotor PG seguido del gen <i>psy2</i> sin término	55
Figura 27. Digestión con <i>BstEII</i> del vector PCR8:pPG::psy2 s/t.....	55
Figura 28. Digestión con <i>NcoI-HindIII</i> del vector pMDC107:pPG::psy2::gfp.	56
Figura 29. PCR de colonias de <i>Agrobacterium</i> portadoras del vector pMDC107:pPG::psy2::gfp.	57
Figura 30. Microscopías de epifluorescencia de frutos de tomate transformados transitoriamente con el vector pMDC107:pPG::psy2::gfp.....	58
Figura 31. Amplificación del promotor PG seguido del <i>pt</i> fusionado al gen <i>crtI</i> sin término.	59
Figura 32. Digestión con <i>PstI-XbaI</i> del vector PCR8:pPG::pt::crtI s/t.	59
Figura 33. Digestión con <i>NcoI-EcoRV</i> del vector pMDC107:pPG::pt::crtI::gfp.	60
Figura 34. PCR de colonias de <i>Agrobacterium</i> portadoras del vector pMDC107:pPG::pt::crtI::gfp.....	61
Figura 35. Microscopías de epifluorescencia de frutos de tomate transformados transitoriamente con el vector pMDC107:pt::crtI::gfp.	62
Figura 36. Diagrama de los filtros de fluorescencia utilizados en este trabajo.	77

LISTAS DE ABREVIATURAS

- PIB: Producto interno bruto
- M.: Millones
- Ton. Toneladas
- OGM: Organismos genéticamente modificados
- WHO: World Health Organization
- há.: hectárea
- g: gramo
- mg: miligramo
- µg: microgramo
- L: litro
- mL: mililitro
- µL: microlitro
- M: molar
- mM: milimolar
- µM: micromolar
- nM: nanomolar
- FW: peso fresco
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- RT: Transcriptasa reversa
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
- RNasa: Ribonucleasa
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ADNp: Ácido desoxirribonucleico plasmidial
- ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario
- DNasa: Desoxirribonucleasa
- dNTPs: Desoxi-ribonucleótido trifosfato
- D.O.: Densidad óptica
- LB: Medio Luria Bertani
- pb: pares de base
- min.: minutos
- hrs.: horas
- Blast: Herramienta de alineamiento básico local de nucleótidos
- °C: Grados Celcius
- 3'UTR: Región no traducible del extremo 3' del ARNm
- GFP: Proteína fluorescente verde
- rpm: Revoluciones por minuto
- UV: Luz ultravioleta
- TE: Tampón Tris-EDTA
- mV : milivolts
- nm: nanómetros
- λ: Longitud de onda
- RB: Borde derecho
- LB: Borde izquierdo
- Sp^R: Resistencia a espectinomicina
- *bar*: Resistencia a fosfomicina

RESUMEN

Los carotenoides son compuestos isoprenoides con un elevado poder antioxidante, sintetizados en los plastidios de organismos fotosintéticos como las plantas, algunas bacterias y hongos. Entre ellos, el β -caroteno es un componente esencial en la dieta humana, al ser el principal precursor de la Vitamina A (retinol), cuya deficiencia genera graves problemas de ceguera. Debido a sus beneficios en la salud humana, nosotros proponemos desarrollar una nueva variedad de manzana capaz de sintetizar pro-Vitamina A. En este trabajo, se usaron herramientas bioinformáticas para optimizar el gen fitoeno sintasa 2 (*psy2*) de *Daucus carota*, enzima que cataliza el primer paso y el clave en la ruta de síntesis del β -caroteno; así como el gen río abajo en la ruta, fitoeno desaturasa (*crtl*) de *Xanthophyllomyces dendrorhous*, fusionado a un péptido de tránsito (*pt*). La expresión fue dirigida por el promotor específico de fruto del gen de la poligalacturonasa de tomate (*pPG*). Estas secuencias fueron utilizadas para sintetizar las construcciones *pPG::psy2::nos* y *pPG::pt::crtl::nos*, las cuales fueron utilizadas para generar dos vectores binarios propios, los cuales fueron transformados transitoriamente en frutos de tomate y manzana mediante Agroinfiltración. A través de análisis de RT-PCR de estos tejidos, demostramos exitosamente la funcionalidad transcripcional de las construcciones. Adicionalmente, mediante fusiones C-terminales a GFP de PSY2 y PT::CRTI, fuimos capaces de comprobar la localización plastidial de ambas proteínas en tomate. Estos resultados demuestran la funcionalidad de las construcciones y sugieren fuertemente el uso de estos vectores con libertad de operar para aumentar el contenido de carotenoides en frutos, a través de ingeniería metabólica de plantas.

ABSTRACT

Carotenoids are isoprenoid compounds with high antioxidant properties, synthesized in plastids of photosynthetic organisms like plants, some bacteria and fungus. Between them, B-carotene is an essential component in the human diet, because it is the main precursor of Vitamin A (retinol), which deficiency leads to severe blindness. Due to their benefits on human health, we proposed to develop a new apple variety able to synthesize pro-Vitamin A. In this work, we used bioinformatics tools to optimize the phytoene synthase 2 (*psy2*) gene of *Daucus carota*, enzyme that catalyzes the first and key step in the B-carotene pathway; as well the downstream phytoene desaturase (*crtI*) gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous*, fused to a chloroplast transit peptide (*pt*). The expression was directed by the fruit-specific promoter of tomato polygalacturonase gene (*pPG*). These sequences were used to synthesized the cassettes *pPG::psy2::nos* and *pPG::pt::crtI::nos*, which were utilized to generate two self-made binary vectors that were transiently transformed in tomato and apple fruits by Agroinfiltration. Through RT-PCR analysis of these tissues, we successfully proved the transcriptional functionality of the cassettes. Additionally, by PSY2 and CRTI GFP C-terminal fusions we were able to check the plastidial localization of both proteins in tomato. These results demonstrate the functionality of the cassettes and strongly suggest the use of these freedom to operate vectors to raise the carotenoid content in fruits, through plant metabolic engineering.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Situación país – Exportación de Manzanas en Chile

La industria frutícola chilena ha sufrido un importante desarrollo en los últimos años, alcanzando un volumen de 2,45 M. de Ton. en exportaciones de fruta fresca (Enero-Octubre del 2011), aportado entre 1 al 1,5% del PIB del país (Mina, 2011a).

Esto ha logrado posicionar a Chile como una potencia agroalimentaria a nivel mundial, líder en las exportaciones desde el hemisferio Sur. El principal destino de exportación de fruta fresca chilena es Estados Unidos, seguido de Holanda (la puerta de entrada al mercado Europeo) y del mercado asiático (Hong Kong, Taiwán, China y Corea del Sur) (Mina, 2011a).

Dentro de las exportaciones de fruta fresca, las manzanas ocupan el segundo lugar, siendo el segundo mayor generador de divisas de la industria frutícola chilena, alcanzando las 788.407 Ton. en el período Enero-Octubre del 2011. Esto significó ingresos de M. \$US 601,278; donde la variedad Fuji generó M. \$US 63,13 de éstos (Mina, 2011a).

En el año 2010 China lideró las exportaciones de manzanas con una participación de 14,2%, seguida de Chile con un 11,4%, lo que sitúa a nuestro país como el segundo mayor exportador mundial de manzanas en este año (Mina, 2011b).

Dentro de la superficie nacional plantada con manzanos, los manzanos rojos representan cerca del 80%, registrándose a Royal Gala, Fuji, Red Chief y Scarlett como las principales variedades. Las variedades Fuji Raku Raku y Fuji son las variedades

rojas que muestran un mayor crecimiento porcentual en el 2010 (15% y 60% respectivamente), donde la variedad Fuji ocupa el tercer lugar de todas las variedades de manzanas plantadas en superficie (3.497 há) (Mina, 2011b).

La superficie plantada de manzanas se ha mantenido estable durante la década 2000-2010, sin embargo la producción se ha visto duplicada, con una tasa de crecimiento anual superior al 7%. De forma similar, el volumen de exportaciones ha aumentado más del doble, registrando una tasa de crecimiento anual del 8%. El valor de las manzanas exportadas se ha triplicado durante la década, aumentando desde US\$ 202 millones en el año 2000 a US\$ 624 millones en 2010, con una tasa de crecimiento anual del 12% (Mina, 2011a).

Para mantener este liderazgo y poder competir con los eficientes productores a nivel mundial, se requieren programas de desarrollo científico-tecnológicos que permitan generar nuevas variedades de manzano, con el fin de abarcar nuevos mercados o potenciar los ya existentes. Junto con esto, se ha observado una creciente motivación por generar nuevos alimentos funcionales que mejoren la calidad de vida y la salud de las personas. Dentro de estos, el uso de antioxidantes es una excelente estrategia, pues eliminan los radicales libres de oxígeno que contribuyen al envejecimiento celular. Debido a esta oportunidad, en el proyecto Fondef dirigido por la Dra. Claudia Stange, del que forma parte este seminario de título, se ha planteado la obtención de una nueva variedad de manzanas Fuji capaz de sintetizar pro-vitamina A y antioxidantes mediante ingeniería metabólica, dado que el contenido original de carotenoides en la manzana es muy bajo ($<2,5 \mu\text{g/g FW}$) (Ampomah-Dwamena y col, 2012).

1.2. Mejoramiento de las variedades frutales en Chile

Los principales objetivos del mejoramiento de las variedades frutales en Chile han intentado mejorar la calidad, aspectos nutricionales, procesos de post-cosecha, resistencia a patógenos y al estrés abiótico. La mayoría de las nuevas variedades se han obtenido a través del fitomejoramiento tradicional, basado en la adquisición de nuevas características mediante cruces naturales y selección de los individuos. Últimamente, se han incorporado las estrategias de Ingeniería genética para el mejoramiento de variedades frutales.

El proceso de fitomejoramiento es una técnica laboriosa con resultados a largo plazo. En cambio la ingeniería genética permite transferir genes de una forma más rápida y más direccionada, donde las tecnologías recombinantes actuales permiten transferir material genético de diversas especies vegetales así como de especies no relacionadas, como los microorganismos (Fraser & Bramley, 2004). El marco regulatorio chileno permite la propagación y la exportación de semillas de OGM, así como la investigación científica de dichos organismos modificados.

En esta línea de investigación en Chile se han desarrollado proyectos de transformación genética de vides (Medina, 2011) (Rosales, 2011) (<http://www.biofrutales.cl>); de cítricos (Arce, 2011); de ciruelo (<http://www.biofrutales.cl>) y de manzanos (Handford, 2011). El actual proyecto se enmarca en esta misma línea de modificación genética de manera tal de otorgar valores nutricionales y antioxidantes a manzanas Fuji, para elevar su contenido de carotenoides.



1.3. Características de los carotenoides, función y biosíntesis

Los carotenoides son compuestos isoprenoides altamente antioxidantes, sintetizados por todos los organismos fotosintéticos como las plantas y las algas, algunas bacterias y hongos no fotosintéticos (Naik y col, 2003).

Los carotenoides poseen un esqueleto hidrocarbonado lineal compuesto por cuarenta átomos de carbono, formado por la condensación de ocho unidades de isoprenos, el que incluye entre 3 y 15 enlaces conjugados dobles. Estos enlaces son responsables del espectro característico de absorción de la luz del cromóforo así como de sus propiedades fotoquímicas (Armstrong & Hearts, 1996; Naik y col, 2003).

En plantas, los carotenoides son sintetizados en los plastidios y son almacenados en los cloroplastos de los órganos fotosintéticos (hojas), donde juegan un papel crucial en la maquinaria fotosintética, participando en el ensamblaje de los fotosistemas y en la captación de la luz, absorbiendo en el rango espectral del azul (400-500 nm) y luego transfiriendo esta energía a la clorofila *a*. Adicionalmente, cumplen un rol crítico como compuestos foto-protectores, neutralizando los radicales libres (singletes de oxígeno y triplete excitado de clorofila) formados por el exceso de energía lumínica en el fotosistema II durante la fotosíntesis, limitando así el daño en las membranas. (Howitt & Pogson, 2006; Maass y col, 2009). También participan en la disipación térmica debido al exceso de energía lumínica absorbida mediante el ciclo de las xantófilas (Armstrong & Hearts, 1996).

Por otro lado, los carotenoides son los pigmentos que otorgan los colores amarillo, naranja y rojo a las flores y los frutos, donde actúan como agentes visuales atractivos de polinizadores y animales distribuidores de semillas (Naik y col, 2003). En

estos órganos los carotenoides se acumulan en los cromoplastos, plastidios especializados en acumular carotenoides, donde son secuestrados en estructuras suborganelares (Maass y col, 2009). Es importante destacar que los carotenoides también son precursores de importantes hormonas vegetales como el ácido abscísico y las estrigolactonas (Nambara & Marion-Poll, 2005; Klee, 2008).

Los animales son incapaces de sintetizar los carotenoides, por lo que dependen de fuentes dietarias para adquirirlos y posteriormente, luego de un clivaje molecular y un proceso reductor, transformarlos en retinoides, como retinal (pigmento visual), retinol (vitamina A) y ácido retinoico (controlador de la morfogénesis). El β -caroteno es un compuesto esencial en la dieta humana al ser el principal precursor de la Vitamina A (retinol), la cual a su vez es requerida para la formación de los dientes, los tejidos sanos, la piel, las mucosas y en el correcto funcionamiento de la retina (Fraser & Bramley, 2004; Krinsky & Johnson 2005). La deficiencia en Vitamina A causa síntomas que van desde la xeroftalmia hasta la ceguera total, la WHO estima que esta deficiencia afecta a 100 millones de niños a nivel mundial, de los cuales 500.000 quedan ciegos cada año (Howitt & Pogson, 2006).

Ya que los carotenoides son fuertes antioxidantes que actúan neutralizando los radicales libres de oxígeno que contribuyen al envejecimiento celular, su consumo, en preferencia de β -caroteno, licopeno, luteína y zeaxantina, puede prevenir ciertas enfermedades humanas como la degeneración de la macula, algunos tipos de cáncer y las enfermedades coronarias crónicas (Mayne, 1996; Landrum & Bone, 2001; Krinsky & Johnson, 2005).

Debido a la vital importancia que tienen los carotenoides en las plantas y en los animales, desde los años 50-60 se han investigado intensivamente los genes que los sintetizan y los factores que regulan su expresión. De hecho, se ha logrado clonar y caracterizar la mayoría de los genes implicados en la ruta de biosíntesis de los carotenoides (Fraser & Bramley, 2004).

Como todos los isoprenoides, los carotenoides son sintetizados a partir de un precursor común de cinco carbonos el isopentenil pirofosfato (IPP). En plantas existen dos vías que sintetizan estos precursores, la vía del ácido mevalónico (MVA) en el citosol y la ruta del metil-eritritol 4 fosfato (MEP). La última se localiza exclusivamente en los plastidios y provee todos los precursores necesarios para la producción de carotenoides en los cloroplastos y los cromoplastos de las células vegetales (Rodríguez y col, 2009). Antes de que comience la elongación de la cadena, el IPP es isomerizado a dimetilalil pirofosfato (DMAPP), el cual se condensa con una molécula de IPP para dar origen al compuesto de C10 geranil pirofosfato (Figura 1). La posterior adición de dos moléculas de IPP darán origen al compuesto de C20 geranil geranil pirofosfato (GGPP), precursor común a otras rutas de biosíntesis (tocoferoles, giberelinas (GA), quinonas y clorofilas) (Naik y col, 2003).

Posteriormente, en lo que comprende el primer paso específico de la ruta de síntesis de los carotenoides, dos moléculas de GGPP se condensan cola con cola para dar origen al compuesto incoloro de C40, fitoeno (Figura 1) (Armstrong & Hearts, 1996). Esta reacción está catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY) y representa el paso limitante en la ruta de síntesis de carotenoides (Giuliano y col, 2008). A continuación el fitoeno sufre cuatro desaturaciones, que darán origen de forma secuencial a fitoflueno, z-

caroteno, neuroesporeno y licopeno. Estas desaturaciones introducen una serie de dobles enlaces simétricos que constituyen el cromóforo característico de los carotenoides y transforman el fitoeno incoloro en el compuesto de color rojo, licopeno (Naik y col, 2003; Howitt & Pogson, 2006). En plantas, estas desaturaciones están catalizadas por las enzimas fitoeno desaturasa (PDS) y z-caroteno desaturasa (ZDS), Z-isomerasa (Z-ISO) y caroteno isomerasa (CRT-ISO); mientras que en bacterias y levaduras existe una única enzima fitoeno desaturasa (CRTI) capaz de introducir los cuatro dobles enlaces requeridos (Beyer y col, 2002; Fraser & Bramley, 2004).

A continuación ocurre la ciclación del licopeno que representa un punto de bifurcación en la ruta de biosíntesis. Por un lado de la ruta, la enzima licopeno β -ciclasa (LCY β) añade dos anillos β a ambos extremos de la molécula de licopeno, generando el β -caroteno. Por el otro lado, la enzima ϵ -ciclasa (LCY ϵ) añade un anillo ϵ en un extremo de la molécula de licopeno formando el δ -caroteno, antes que un anillo β sea añadido en el otro extremo de la molécula por la LCY β , formando finalmente el α -caroteno (Figura 1) (Howitt & Pogson 2006). Posteriormente, el α -caroteno y el β -caroteno son oxidados enzimáticamente para dar origen a las xantófilas, el α -caroteno es hidroxilado a luteína, mientras que el β -caroteno es hidroxilado a zeaxantina, la cual por posteriores epoxidaciones generará finalmente ácido abscísico (ABA) (Figura 1) (Schwartz y col, 1997).

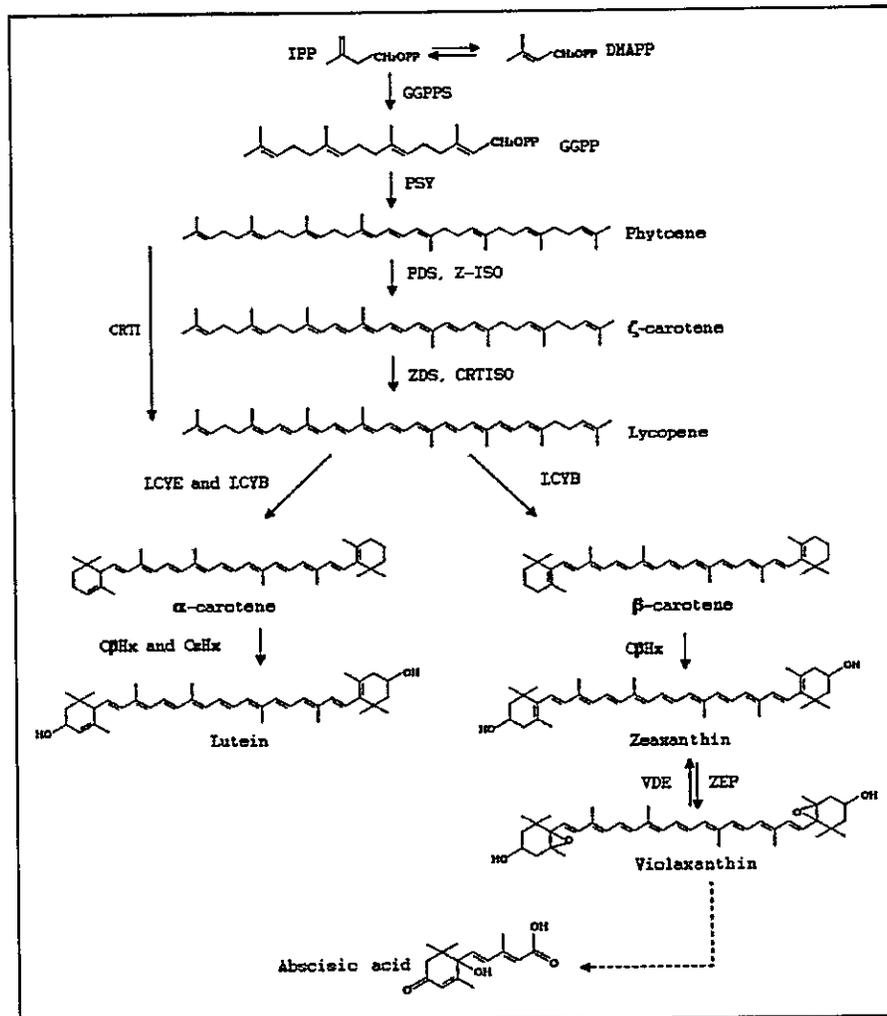


Figura 1. Ruta de biosíntesis de carotenoides. Ilustración de la ruta de síntesis de carotenoides desde la formación del precursor GGPP que da origen al primer carotenoide (fitoeno) hasta la hormona ácido absicico. IPP: isopentenil pirofosfato, DMAPP: dimetilalilpirofosfato, GGPPS: geranylgeranylpirofosfato sintasa, GGPP: geranylgeranylpirofosfato, PSY: fitoeno sintasa, PDS: fitoeno desaturasa, ZDS: z-caroteno desaturasa, Z-ISO y CRTISO: isomerasas de carotenoides; CRTI: fitoeno desaturasa bacteriano, LCYB: licopeno β ciclasa, LCYE: licopeno ε ciclasa, CβHx y CεHx: β y ε hidroxilasas; VDE: violaxantina de-epoxidasa; ZEP: zeaxantina epoxidasa. Modificado de (Fuentes y col, 2012).

1.4. Manipulación genética de la ruta de síntesis de los carotenoides

Las investigaciones en la última década se han enfocado en la manipulación del contenido de carotenoides en los cultivos, con el fin de mejorar su valor nutricional para el consumo humano.

La enzima PSY se encuentra en un punto de bifurcación ya que su sustrato (GGPP) es compartido con otras rutas esenciales, por ende su actividad dirige este precursor de forma irreversible hacia la ruta de biosíntesis de carotenoides (Naik y col, 2003). Por ejemplo, durante el proceso de maduración del fruto del tomate los niveles de carotenoides (principalmente licopeno y β -caroteno) aumentan de forma significativa, lo que se correlaciona positivamente con un aumento considerable de la expresión de los genes *psy-1* y *pds*. Este aumento se relaciona directamente con un incremento en los niveles de actividad enzimática en los frutos, extrapolarlo la expresión génica a nivel enzimático (Fraser y col, 1994). Adicionalmente, el cálculo de los coeficientes de control del flujo metabólico en *S. lycopersicum* ha permitido probar que la enzima PSY-1 ejerce el mayor control sobre el flujo en la ruta de biosíntesis de los carotenoides (Fraser y col, 2002). Debido a estos antecedentes muchos estudios de manipulación genética se han enfocado en potenciar la enzima PSY.

Uno de los primeros avances en esta área fue el desarrollo de plantas de tomate sobre-productoras del gen endógeno *psy-1* (PSY específica del fruto de tomate) de forma constitutiva. Estas plantas exhibían efectos pleiotrópicos negativos, tales como enanismo, por el re-direccionamiento del flujo metabólico de las GAs hacia la ruta de síntesis de carotenoides, exhibían elevados niveles de carotenoides en tejidos normalmente carentes de ellos como raíces y semillas, así como una disminución de los carotenoides en el fruto del tomate debido a co-supresión (Fray y col, 1995). Para evitar estos efectos, posteriormente se utilizó el promotor de la poligaracturonasa (PG) para obtener plantas de tomate que expresaran el gen bacteriano de la PSY (*criB*) de forma

fruto específica, lográndose entre 2 a 4 veces de aumento en los carotenoides totales (Fraser y col, 2002).

Otro ejemplo es el caso de *Arabidopsis thaliana*, donde la expresión del gen *psy* endógeno de forma constitutiva generó un aumento de 10 veces en el callo fotosintético y de hasta 100 veces en la raíz (Maass y col, 2009). La expresión del mismo gen endógeno bajo un promotor específico de semilla generó plantas transgénicas que producen semillas más oscuras con elevados niveles de todos los carotenoides y con un aumento de 43 veces en el contenido de β -caroteno (Lindgren y col, 2003).

La sobre-expresión del gen *psy* ha tenido resultados tan espectaculares como en el caso de la canola (*Brassica napus*), donde la transformación solo del gen de la fitoeno sintasa de *Erwinia uredovora* (*crtB*), bajo el control del promotor específico de semilla, resultó en embriones de color naranja con semillas maduras que presentaron un aumento de 50 veces en los carotenoides totales y de 240 veces en el de β -caroteno (Shewmaker y col, 1999).

La desaturación del fitoeno es otro paso que se ha manipulado exitosamente, lográndose obtener plantas de tomate que expresen el gen bacteriano de la fitoeno desaturasa (*crtI*) de forma constitutiva, con resultados de hasta 3 veces de aumento en el β -caroteno (Römer y col, 2000).

Sin embargo, existen variedades vegetales donde el aumento en la expresión únicamente de uno de los genes de la ruta no es suficiente para elevar los niveles de carotenoides. Este es el caso del arroz, donde fue necesaria la sobre-expresión en conjunto de la enzima PSY y PDS para acumular β -caroteno, luteína y zeaxantina (Beyer y col, 2002). La fuente de origen del gen *psy* ha demostrado ser importante en los

niveles de acumulación de los carotenoides obtenidos. El “golden rice 2” que sobre-expresa el gen *psy* de *Zea Mais* acumula 23 veces más carotenoides que el golden rice original, que sobre-expresa el gen *psy* de la flor de narciso (Paine y col, 2005).

Algo similar sucede con el maíz donde la expresión en conjunto del gen *psyl* de *Z. mais* y el gen *crtI* de *Pantoea ananatis* bajo un promotor específico de endosperma, generó un aumento de 142 veces en los carotenoides totales, en comparación con la sobre-expresión únicamente del gen *Zmpsyl* que resultó en un aumento sólo de 53 veces (Zhu y col, 2008).

El trigo es otra especie vegetal donde fue necesario expresar el gen *psyl* de *Z. mais* bajo un promotor específico de endosperma, en conjunto con el gen bacteriano de la fitoeno desaturasa (*crtI*) de *E. uredovora* bajo un promotor constitutivo, para lograr un aumento de 10,8 veces en los carotenoides totales (Cong y col, 2009).

1.5. Organismos seleccionados como dadores de los genes carotenogénicos

Tanto el genotipo de la planta aceptora como el origen de los genes carotenogénicos seleccionados han demostrado ser importantes en los niveles finales de los carotenoides obtenidos. En el proyecto que se enmarca este Seminario de título, se decidió obtener los genes carotenogénicos a partir de organismos que naturalmente acumulan elevados niveles de carotenoides.

Uno de estos organismos corresponde a *Daucus carota* (zanahoria), nuestro modelo de estudio, una de las especies vegetales que acumula de forma natural los mayores niveles de β -caroteno en su raíz modificada crecida en oscuridad, llegando a acumular 900 $\mu\text{g/g}$ de peso seco a las doce semanas de desarrollo. Por otro lado, la zanahoria también es capaz de acumular β -caroteno en sus hojas expuestas a luz,

llegando a acumular 400 $\mu\text{g/g}$ de peso seco a las 12 semanas de desarrollo (Pizarro, 2008).

Dada la gran importancia que tiene el gen fitoeno sintasa en el control del flujo metabólico y los excelentes resultados obtenidos de su expresión en diversos organismos, se propuso utilizar el gen *psy* de *D. carota*, para aumentar el contenido de carotenoides en manzanas Fuji, mediante ingeniería metabólica.

En la zanahoria, se han descrito dos genes parálogos para la fitoeno sintasa, denominados *psy1* y *psy2*, en un estudio previo realizado para determinar los patrones de expresión de los genes carotenogénicos durante el desarrollo tanto en raíz como en hojas de *D. carota*, se observó que la expresión del gen *psy1* aumenta durante el desarrollo de las hojas, mientras que su gen parálogo *psy2* disminuye. Por otra parte, durante el desarrollo de la raíz en oscuridad el gen *psy2* presenta un aumento levemente mayor entre la cuarta y la décimo-segunda semana de desarrollo, en comparación con el gen *psy1* (Fuentes y cols, 2012). Estos resultados sugieren que el gen *psy2* estaría especializado en la síntesis de carotenoides en cromoplastos, haciéndolo un buen candidato para ser usado en aplicaciones biotecnológicas en manzanas.

Por otro lado, la funcionalidad del gen *psy2* de *D. carota* se demostró por expresión heteróloga en *Nicotiana tabacum*. En estas plantas la expresión de este gen logró aumentar los niveles de carotenoides en cuatro de las siete líneas analizadas, generando un aumento de un 63% en los carotenoides totales y de un 56% en el β -caroteno. Por el contrario, la sobreexpresión del gen *psy1* solo logró elevar los niveles de carotenoides y de β -caroteno en un 24% y un 21%, respectivamente (Acevedo, 2011).

Estos resultados validarían la utilización del gen heterólogo *psy2* de *D. carota* como herramienta biotecnológica.

El otro organismo seleccionado, corresponde a la levadura basidiomycete *Xanthophyllomyces dendrorhous*, levadura capaz de acumular hasta 0,5% de su peso seco en astaxantina, cetocarotenoide derivado del β -caroteno. La astaxantina es un pigmento de color rojo que otorga el color característico a algunas aves (flamingo), crustáceos (camarón) y peces como el salmón y la trucha. Estos animales son incapaces de sintetizar este pigmento pero lo acumulan en grandes cantidades a través de la dieta. La astaxantina es un fuerte antioxidante, se ha visto que contribuye a la salud de los ojos y la piel y está implicada en la prevención de la diabetes, tiene actividad anticancerígena e anti-inflamatoria y aumenta la respuesta inmune (Schroeder & Johnson, 1993; Higuera y col, 2006; Zhu y col, 2009; Rodriguez-Saiz y col, 2010).

En *X. dendrorhous* la astaxantina es sintetizada a través de la ruta del ácido mevalónico (MVA) a partir del IPP, precursor común de todos los isoprenoides descritos anteriormente. Para el desarrollo de manzanas con mayor contenido de carotenoides, hemos decidido utilizar el gen *cr1l* proveniente de la levadura *X. dendrorhous* (Figura 1), dado que en plantas las desaturaciones del fitoeno están catalizadas por al menos dos enzimas. La funcionalidad del gen *cr1l* se demostró por mutagénesis sitio dirigida usando el método del doble recombinante con el constructo de higromicina. Se observó que la delección del gen *cr1l* en la cepa homocigota ocasiona un fenotipo completamente albino (Niklitschek y col, 2008).

El producto génico del gen *cr1l* deberá ser destinado a plastidios en la manzana, para lograr esto se utilizará el péptido de tránsito de la subunidad pequeña de la Ribulosa

Bifosfato Carboxilasa (RUBISCO) de arveja (*pt*). La funcionalidad de este péptido de destinación fue demostrada previamente por inmuno-localización con partículas de oro del producto génico del gen *crtI* de *Erwinia uredovora* observándose la localización de la proteína preferentemente en los tilacoides de plantas transgénicas de tabaco (Misawa y col, 1993).

1.6. Expresión de carotenoides de forma fruto específica

Como se mencionó en la sección 1.3 la expresión constitutiva de los genes carotenogénicos claves en la ruta de síntesis, lleva muchas veces a efectos pleiotropicos negativos, debido al re-direccionamiento del IPP hacia la síntesis de carotenoides en desmedro de otros metabolitos y hormonas. Es por esto que en el proyecto en el que se enmarca este Seminario de título se utilizará un promotor tejido específico, tal como ha sido utilizado por otros autores para elevar exitosamente el contenido de carotenoides en las semillas de *Arabidopsis* (Lindgren y col, 2003), endosperma de arroz (Beyer y col, 2002), tubérculos de papa (Diretto y col, 2007), semillas de canola (Shewmaker y col, 1999) y frutos de tomate (Fraser y col, 2002).

El proceso de maduración de los frutos conlleva una serie de cambios estructurales, bioquímicos y fisiológicos. Muchos de estos cambios se deben a nuevas actividades enzimáticas resultantes del cambio en la expresión génica (Mansson y col, 1985). Uno de ellos es el gen de la poligalacturonasa (PG) de tomate, hidrolasa responsable de la degradación de poliuronidas o pectinas de la pared celular (DellaPenna y col, 1986). La poligalacturonasa se acumula durante la maduración del fruto y se ha demostrado que este aumento se debe a una activación transcripcional del gen durante la maduración (Sheehy y col, 1987; DellaPenna y col, 1989).

Estudios previos han demostrado que la región comprendida entre la base -1 a -806 es suficiente para dirigir la expresión fruto maduro específica del gen reportero β -glucuronidasa (GUS) a todo el pericarpo del tomate (Montgomery y col, 1993). Este fragmento del promotor fue aislado de la variedad nativa de tomate (*Solanum lycopersicum L. chilense*) y evaluado funcionalmente en nuestro laboratorio, comprobando que es capaz de inducir la expresión de la proteína GFP en tomate y de inducir la expresión del gen de la sorbitol deshidrogenasa de *M. domestica*, cuantificada mediante RT-PCR en frutos de tomate y duraznos (Aguayo, 2010). Por ello, hemos seleccionado este fragmento del promotor de PG (pPG) para dirigir la expresión de los genes carotenogénicos al pericarpo de frutos de manzana.

Considerando los antecedentes expuestos se diseñará y construirá un vector propio en el cual se clonarán los genes *psy2* de *D.carota* y *crtI* de *X. dendrorhous* bajo el promotor fruto-específico de la poligalacturonasa. Con ellos se espera aumentar el contenido de β -caroteno y carotenoides totales en el pericarpo de la manzana.

1.7. Objetivos

1.7.1. Objetivo general

Generar y analizar funcionalmente los vectores binarios que expresen de forma fruto específica los genes carotenogénicos *psy2* de *D. carota* y *crtI* de *X. dendrorhous* en plantas.

1.7.2. Objetivos específicos

1. Generar un nuevo vector binario (pCP) que contenga el marcador de selección *bar* y un sitio de múltiple clonamiento.
2. Obtener las construcciones génicas pCP:*psy2*, para la expresión del gen *psy2* de *D. carota* y pCP:*psy:crtI*, para la expresión del gen *psy2* de *D. carota* y *crtI* de *X. dendrorhous*.
3. Evaluar la funcionalidad transcripcional de las construcciones, mediante análisis moleculares de frutos de *Solanum lycopersicum* y *Malus domestica* transformados transitoriamente.
4. Determinar la localización subcelular de las proteínas PSY2 de *D. carota* y PT::CRTI de *X. dendrorhous*, mediante fusiones a GFP y análisis bioinformáticos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Material Biológico

* **Obtención de frutos de tomate para ensayos de expresión**

Para los ensayos de expresión por agro-inyección, se adquirieron comercialmente frutos de tomate hidropónicos inmaduros (*Solanum lycopersicum*), los que fueron seleccionados por presentar un exocarpo verdoso/amarillo con una alta resistencia a la presión.

* ***Escherichia coli* cepa DH5a**

F-, ϕ 80lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk⁻,mk⁺), *phoA*, *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*.

* ***Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101**

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

2.1.2. Reactivos

Se utilizaron reactivos de alta calidad para biología molecular y/o análisis fabricados por Fermentas, Promega, Invitrogen, Axygen, Merck, New England Biolabs y Phyto Technology Laboratories.

2.2. Cultivos bacterianos y transformaciones

2.2.1. Obtención de *E.coli*, cepa DH5a quimio-competentes.

Se inoculó 100 μ L de *E.coli* DH5a en 3 mL de medio LB líquido (1% triptona, 1% extracto de levadura, 0,8 % NaCl) y se incubó a 37°C con agitación (150-200 rpm) toda

la noche (16 hrs.). Se tomó 1 mL de este cultivo y se inoculó 250 mL de SOB (2% triptona, 0,5% extracto levadura, 0,0584% NaCl, 0,0186% KCl, 0,24% MgSO₄, pH 7,5), el que se incubó a 37°C con agitación hasta una D.O.₆₀₀ de 0,3. A continuación, el cultivo se centrifugó a 3.000 g por 10 min. a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado de células se resuspendió suavemente en 20 mL de CCMB80 (10 mM KOAc pH 7, 80 mM CaCl₂, 20 mM MnCl₂, 10 mM MgCl₂, glicerol 10%, pH 6,4) estéril y frío, posteriormente se unieron 40 mL de células resuspendidas en un solo tubo y se incubó en hielo por 20 min.. Luego se centrifugó (2.000xg, 8 min., 4°C), se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células suavemente en 10 mL de CCMB80. A continuación se unieron todas las células en un solo tubo y se midió la D.O.₆₀₀ de una mezcla de 200 µL de células y 800 µL de SOB, posteriormente se agregó medio CCMB80 hasta que se alcanzó una D.O.₆₀₀ 1-1,5. Finalmente se incubó en hielo por 20 min. y las células se alicuotaron de 100 µL en tubos Eppendorf estériles y fríos y se guardaron a -80°C. Todo el procedimiento se realizó manteniendo la esterilidad.

2.2.2. Transformación de *E. coli*, cepa *DH5α* quimio-competentes.

Una alícuota de *E. coli* quimiocompetente (sección 2.2.1) se descongeló en hielo, se mezcló con 50-100 ng del vector de interés y se incubó en hielo por 30 min.. A continuación se les dio un golpe térmico a 42°C por 30 segundos, se traspasó rápidamente a hielo y se incubó por 2,5 min. Luego se agregó 1 mL de LB líquido y se incubó a 37°C en agitación por 1 hora. Finalmente se plaqueó en LB sólido (mezcla anterior suplementado con 1,5% de agar) suplementado con el antibiótico correspondiente a una concentración final de 100 mg/L y se incubó por 16 horas a 37°C (Tabla 1).

Tabla 1. Antibióticos usados para la selección de los clones positivos de los vectores generados en este seminario de título.

Vector	Antibiótico de selección
pCP, pCP:pPG::psy2::nos, pCP:pPG::psy2::nos-pPG::pt::crtl::nos,	Espectinomicina
pUC57:pPG::psy2::nos, pUC57:pPG::pt::crtl::nos	Ampicilina
PCR8:pPG::psy2 s/t, PCR8:pPG::pt::crtl s/t	Espectinomicina
pMDC107:pPG::psy2::gfp, pMDC107:pPG::pt::crtl::gfp	Kanamicina

2.2.3. Obtención de *Agrobacterium tumefaciens*, cepa GV3101 competente.

Se realizó un pre-inoculó en 5 mL de LB líquido suplementado con 50 mg/L de gentamicina y 10 mg/L de rifampicina, crecido a 28°C en agitación por 16 horas. Luego, se vertió los 5 mL de cultivo en 100 mL de LB líquido, manteniendo las condiciones de cultivo y los antibióticos mencionados, hasta que se alcanzó una D.O.₆₀₀ de 0,5. Se incubó en hielo por 10 min., se centrifugó (3000xg, 20 min., 4°C), se eliminó el sobrenadante y el precipitado de células fue resuspendido suavemente en 1 mL de CaCl₂ 20 mM frío y estéril. Las células se alicuotaron de 100 µL en 30% de glicerol a -80°C.

2.2.4. Transformación de *A. tumefaciens*.

Una alícuota de la sección 2.2.3 se descongeló en hielo y se mezcló con 300-500 ng del vector de interés. Luego se sometió a un golpe de frío sumergiéndola 5 min. en N_{2(l)} para posteriormente permitir su descongelamiento a temperatura ambiente por 15 min.. Se agregó 1 mL de LB líquido y se incubó con agitación a 28°C por 6 horas. Luego se centrifugó (6000xg, 5 min.), se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado de células en 100 µL de LB líquido. Finalmente se plaqueó en LB sólido suplementado con rifampicina 10 mg/L, gentamicina 50 mg/L y el antibiótico de selección del vector de interés (Tabla 1) y se incubó por 36-48 horas a 28°C.

2.3. Métodos de Biología Molecular

2.3.1. Extracción de ADN plasmidial.

2.3.1.1. Método de purificación de ADN plasmidial mediante “kit” comercial.

El clon de interés se incubó en 5 mL de LB líquido suplementado con el antibiótico de selección por 16 horas a 37°C en agitación. Posteriormente se extrajo el ADN de acuerdo a las instrucciones del fabricante, AxyPrepTM plasmid miniprep de Axygen Biosciences. El ADN plasmidial fue utilizado para digestiones enzimáticas que posteriormente fueron purificadas y para recombinaciones.

2.3.1.2. Método de purificación de ADN plasmidial mediante lisis alcalina.

Se tomó 1,5 mL de un cultivo de noche de *E. coli* transformadas con el vector de interés, se centrifugó (10.000xg, 1 minuto), se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 50 µL de LB líquido. Luego se agregó 300 µL de amortiguador TENS (TRIS pH 7,5 10 mM, EDTA pH 8 1mM, NaOH 0,1 M y SDS 0,5%) y se mezcló por vortex por 2 segundos. A continuación se agregó 150 µL de KAc (ph 4,7 3M), se mezcló en vortex por 2 segundos y se centrifugó (2 min., 10.000xg). Se traspasó el sobrenadante a un tubo limpio, se agregó 900 µL de etanol absoluto a temperatura ambiente y se centrifugó (2 min., 10.000xg). Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado dos veces con etanol 75% frío. Finalmente se seco el ADN al aire y se resuspendió en 20 µL de agua libre de nucleasas suplementado con RNAsas 10 µg/mL. Este ADN plasmidial fue utilizado para hacer digestiones enzimáticas para seleccionar las colonias transformantes con el vector pCP:*psy2* y PCP:*psy2:crtI*.

2.3.2. Cuantificación y visualización del ADN mediante electroforesis.

Las muestras de ADN fueron visualizadas en geles de agarosa, de concentraciones variables (1% a 1,5%) de acuerdo al tamaño del fragmento, preparados en TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, ácido acético glacial 19 mM, EDTA 1mM), que también es el tampón de corrida. Previo a cargar las muestras se les agregó tampón de carga (Azul de bromofenol 0.25%, xilene cianol 0.25% y glicerol 80%) en razón 5:1. El gel fue sometido a electroforesis a 90-100 mV por tiempos variables (40-60 min.). Se realizaron electroforesis por 1,5 horas para separar y purificar fragmentos muy cercanos en su peso molecular (pUC57:*psy2* digerido con *SpeI*, pUC57:*crtI* digerido con *XhoI*). Luego se tñó el gel por 20 min. en Bromuro de etidio 1 mg/L y se visualizó con un transiluminador UV (GeneGenius Classic de SynGene). Las imágenes proporcionadas fueron evaluadas mediante Image J y la concentración del ADN fue cuantificada de acuerdo al estándar de peso molecular.

2.3.3. Purificación banda de ADN desde geles de agarosa.

Los fragmentos de ADN del tamaño de interés fueron purificados a partir de geles de agarosa mediante el "kit" de purificación de ADN desde geles Wizard[®] SV Gel and PCR Clean Up System de Promega, según indicaciones del fabricante.

2.3.4. Digestiones enzimáticas.

2.3.4.1. Digestiones enzimáticas para la obtención de las construcciones génicas.

Se realizaron diversas digestiones enzimáticas para obtener las construcciones génicas descritas en 2.3.7, en este tipo de digestiones se utilizaron entre 800 ng a 1 ug de ADN como templado, entre 10 a 20 unidades enzimáticas, amortiguador 1X de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se incubó a 37°C por 16 hrs. Las digestiones dobles se realizaron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (<http://www.thermoscientificbio.com>).

2.3.4.2. Digestiones enzimáticas para verificar presencia y orientación del inserto.

Se realizaron diversas reacciones de digestión enzimática a los ADN plasmidiales de los vectores pUC57, pCR[®]8, pMDC107, pCP:*psy2* y pCP:*psy2::crtI*. Se utilizaron 250 ng de vector de interés, 5-10 unidades enzimáticas, amortiguador 1X correspondiente (según recomendaciones del fabricante) en un volumen final de 20 µL y se incubaron en un baño termoregulado a 37°C entre 4-16 horas. Detalle de enzimas utilizadas (Tabla 2.)

Tabla 2. Lista de enzimas de restricción utilizadas para verificar la presencia y orientación del inserto en los vectores generados en este seminario de título.

Vector	Enzimas de Restricción
pCP	<i>NheI-SpeI NdeI-XhoI</i>
pUC57:pPG:: <i>psy2::nos</i>	<i>BamHI</i>
pUC57:pPG:: <i>pt::crtI::nos</i>	<i>KpnI</i>
pCP:pPG:: <i>psy2::nos</i>	<i>HindIII</i>
pCP:pPG:: <i>psy2::nos-pPG::<i>pt::crtI::nos</i></i>	<i>BstEII</i>
PCR8:pPG:: <i>psy2 s/t</i>	<i>BstEII</i>
PCR8:pPG:: <i>pt::crtI s/t</i>	<i>PstI- XbaI</i>
pMDC107:pPG:: <i>psy2::gfp</i>	<i>NcoI-HindIII</i>
pMDC107:pPG:: <i>pt::crtI::gfp</i>	<i>NcoI-EcoRV</i>

2.3.5. Diseño de partidores

Los partidores fueron diseñados manualmente o utilizando el programa vector NTI y CBS ProbeWiz verificándose mediante el software OligoAnalyzer (<http://www.idtdna.com>) los porcentajes de GC, la temperatura de disociación y descartándose la presencia de homo y heterodímeros. La especificidad de los partidores fue analizada mediante Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para amplificar el fragmento *pPG::pt::crtI* y *pPG::psy2* sin el codón de término, se diseñaron partidores en antisentido que hibridaran hasta el codón previo de TGA, sin alterar el marco de lectura. El diseño de los partidores para *psy2* de *D.carota* utilizados en el RT-PCR (2.3.6.3) se realizó en la región 5' del gen, lugar donde existe la mayor divergencia en la secuencia nucleotídicas con otras *psy* (*psy1* y *psy2* de *S. lycopersicum*, *psy2*, 3 y 11 de *Malus domestica*). Se tomó la misma precaución con los partidores específicos para el gen *crtI* de *X. dendrorhous* tomándose la región central para el diseño. En la Tabla 3 se ilustran las secuencias y las características de los partidores.

Tabla 3. Partidores utilizados durante este seminario de título.

Nombre	Secuencia (5'-3')	T ^m (°C)	Tamaño (pb)	Descripción
<i>dxr</i> F'	AGTAGCGGATGCGTTGAAGC	62	653	Partidores diseñados para amplificar el gen <i>dxr</i> de <i>A. thaliana</i> fusionado a <i>egfp</i> en el vector pB7FWG2.
<i>egfp</i> R'	CGACCAGGATGGGCACCAC	64		
<i>psy2</i> opt. s/stop R'	GGTCTCAAGAAGGTGCTGC	62	2.124	Partidores diseñados para amplificar el promotor PG seguido del gen <i>psy2</i> de <i>D.c.</i> optimizado sin el codón de término.
<i>pPG</i> F'	GTACCATCACATAATTGAGACG	62	2.719	
<i>crtI</i> opt. s/stop R'	GAAAGCCAAAACCTCCAACGC	60		Partidores diseñados para amplificar el promotor PG seguido del <i>pt</i> y del gen <i>crtI</i> de <i>X.d.</i> optimizado sin el codón de término.

SMC F'	GTAAAACGACGGCCAG	50	116	Partidores diseñados para amplificar el SMC del vector pCP.
SMC R'	GTCATAGCTGTTTCCTG	50		
<i>psy2</i> opt. R'	CTGCTGGTCTAGCGGTTGGAG	70	1090	Partidores diseñados para amplificar el gen <i>psy2</i> de <i>D.c.</i> optimizado.
<i>psy2</i> opt. F'	CTGGGAGGAAGCGAGTTGGAG	70		
<i>psy2</i> opt. R' Interno	CAATCCAACGGTTCAGC	56	606	Se realizó un RT-PCR en conjunto con el partidor de <i>psy2</i> opt F'.
<i>crtI</i> opt. F'	ACAACAGTCAGCCGTGCCTC	64	1324	Partidor diseñado para amplificar el <i>pt</i> de arveja fusionado al gen <i>crtI</i> de <i>X.d.</i>
<i>crtI</i> opt. R'	TCCTTCCCTCTGGAGCAGC	64		
<i>qpsy2</i> opt. R'	AACCATGCTGCTGTGAACTG	60	131	Partidor para qPCR utilizado para amplificar el extremo 5' del ARNm del gen <i>psy2</i> optimizado de <i>D.c.</i>
<i>qpsy2</i> opt. F'	GGAGGAAGATTGGAGAAGGG	62		
<i>qcrtI</i> opt. F'	TGCTGAGAAGGTTACAGATG	60	120	Partidor para qPCR utilizado para amplificar la región central del ARNm del gen <i>crtI</i> optimizado de <i>X.d.</i>
<i>qcrtI</i> opt. R'	GTGTCTGGTCTTGGTCTGA	62		
<i>18S</i> F'	TTGATTACGTCCCTGCCCTT	62	196	Gen housekeeping. Utilizado para verificar la calidad del ADNc.
<i>18S</i> R'	ACAATGATCCTCCGCAGGT	62		
<i>gfp</i> R'	TTCGTTGGGATCTTTCGAAAGGGC	72	<i>crtI::gfp</i> (2609) <i>psy2::gpf</i> (1824)	Partidor utilizado para amplificar las construcciones <i>pt::crtI::gfp</i> en conjunto con <i>crtI</i> opt. F' y <i>psy2::gfp</i> en conjunto con <i>psy2</i> opt. F'.

2.3.6. Reacciones de PCR

2.3.6.1. PCR convencional

Se digirió el vector pUC57:*psy2* con *SpeI* y el vector pUC57:*crtI* con *XhoI* (2.3.4.1), se purificó la banda (2.3.3.) correspondiente a las construcciones sintetizadas (2.3.7.1-2) y se usaron entre 3-5 ng como templado para la reacción de PCR, donde se amplificó el promotor PG seguido del gen *psy2* de *D. carota* sin el codón de término (s/t) y el promotor PG seguido del péptido de tránsito y del gen *crtI* de *X. dendrorhous* s/t. Estas reacciones de PCR se llevaron a cabo con 0,5 µL de "mix" Elongasa ADN polimerasa

(Invitrogen), 1X del tampón de B ($MgCl_2$ 2 mM), dNTPs (Fermentas) 200 μ M, 200 nM de partidor en sentido, 200 nM de partidor en antisentido (Tabla 3) en un volumen final de 25 μ L.

También se realizaron reacciones de PCR para verificar la presencia del inserto utilizando ADN plasmidial de los vectores obtenidos como templado (3-5 ng). Además para verificar la correcta síntesis de ADNc se realizaron reacciones de PCR convencional amplificando genes "housekeeping" (18S). Finalmente también se amplificaron los genes *psy2* *D.carota* y *cr1l* de *X. dendrorhous*, usando los ADNc obtenidos como templado, para verificar la funcionalidad transcripcional de los vectores obtenidos. Todas estas reacciones de PCR se llevaron a cabo de la forma previamente descrita, pero utilizando 1 U de Taq DNA polimerasa (Sigma), 1X del tampón de la Taq DNA polimerasa (Sigma) y 1-2 μ L de ADNc. En todas las reacciones de PCR se realizó una reacción de control negativo, carente de templado y cuando fue posible, una reacción de control positivo, utilizando un templado verificado previamente. En el caso de los PCR para la verificación de la correcta síntesis de ADNc, se incluyó un control "sin RT", el que consistió de una reacción usando como templado una cantidad equivalente de ARN luego del tratamiento con DNasa I.

2.3.6.2. PCR de colonias.

Para verificar inicialmente la presencia del inserto en las colonias de *E.coli* o *A. tumefaciens* transformadas, se resuspendieron las colonias crecidas en las placas de LB sólido suplementadas con el antibiótico(s) de selección, en 10 μ L de agua libre de nucleasas. Se tomó 1 μ L como templado para la reacción de PCR y el resto se propagó

en medio LB líquido suplementado con antibiótico de selección. La reacción se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito para la Taq DNA polimerasa en el punto 2.3.6.1.

2.3.6.3. RT-PCR.

Para analizar la expresión de los genes de interés se realizó la síntesis de la hebra complementaria del ARNm, utilizando al enzima de transcripción reversa RT-Impron II. Luego de la extracción de ARN (2.3.9) se trataron 2 µg de éste con una mezcla compuesta por 1 U de DNasaI, 1X amortiguador DNasaI con MgCl₂, 20 U de Inhibidor de RNasa (Ribolock) y agua libre de nucleasas a un volumen final de 10 µL, durante 30 min. a 37°C. Posteriormente se detuvo la reacción agregando 0,5 uL de EDTA 50 mM. Luego, se tomaron 5,5 µL de esta mezcla y se incubaron con 1 µL de oligo AP 10 mM (5'-CGCCACGCGTCGACTAGTAC TTTTTTTTTTTTTTTTTT -3') por 5 min. a 70 °C en el termociclador, luego se detuvo el programa, se incubaron los tubos en hielo y se agregó 13,5 µL de la mezcla de RT (1 uL de RT Improm II (Promega), 20 U de Inhibidor de RNasa (Ribolock, Fermentas), dNTPs 500 µM (Fermentas), MgCl₂ 3,125 mM, 5 uL de tampón 5X de RT Improm II y se continuó con el programa RT-PCR.

Tabla 4. Programas de PCR utilizados en este seminario de título.

1: PCR convencional Taq polimerasa.

	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
Paso 1	94°C/ 5 min.	94°C/ 30 seg.	72°C/10 min.
Paso 2	--	T°H/30 seg.	--
Paso 3	--	72°C/30seg-1 min	--
N° de ciclos	1	32-35	1

T°H: SMC = 47°C, *psy2* opt. F' con *psy2* opt. R' Interno = 59°C, *qpsy2* opt. = 60°C, *qcrtI* opt. = 62°C, *l8S* = 55°C. El tiempo de elongación se calculó de acuerdo a V_{Taq}=1Kb/min y el largo del fragmento esperado.

2: PCR convencional Elongasa

	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
Paso 1	94°C/ 5 min.	94°C/ 30 seg.	72°C/10 min.
Paso 2	--	58°C/30 seg.	--
Paso 3	--	68°C/ 3 min	--
N° de ciclos	1	35	1

3: PCR de colonias

	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
Paso 1	94°C/ 5 min.	94°C/ 30 seg.	72°C/10 min.
Paso 2	--	T [°] H/30 seg.	--
Paso 3	--	72°C/1-2:30 min	--
Nº de ciclos	1	32-35	1

T[°]H: *dxr* F' con *egfp* R' = 58°C, *psy2* opt. = 65°C, *crfI* opt. = 64°C, *psy2* opt. F' con *gfp* R' = 67°C, *crfI* opt. F' con *gfp* R' = 65°C. El tiempo de elongación se calculó de acuerdo a V_{Taq}=1Kb/min y el largo del fragmento esperado (Tabla 3).

4: RT-PCR

	Segmento 1	Segmento 2
Paso 1	70°C/ 5 min.	42°C/ 60 min.
Paso 2	25°C/ 5 min.	70°C/ 15 min.
Nº de ciclos	1	1

2.3.7. Construcciones génicas.

2.3.7.1. Diseño bio-informático: Construcción génica *pPG::psy2::nos*.

En orden de optimizar tiempo se diseñó bio-informáticamente usando el programa Vector NTI[®] de Invitrogen, una construcción génica que consta de 737 pb del promotor PG de tomate seguido de 67 pb del extremo 5' no traducible del mismo gen (denominado pPG) (gi.19295: :675-1479); la secuencia codificante del gen *psy2* de *D. carota* (1.317 pb) (gi.DQ192187.1:357-1673), que incluye su péptido de tránsito a cloroplasto y el extremo 3' no traducible del gen de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (terminador *nos* de 277 bp) (gi. 332144932:3044-3320). La construcción fue flanqueada por la enzima de restricción *SpeI*, que no corta ninguna de las secuencias mencionadas y sólo una vez en el sitio múltiple de clonamiento del vector de destinación (pCP). Se realizó la optimización del uso de codones para la secuencia del gen *psy2* de *D. carota*, usando el programa online OPTIMIZER (<http://genomes.urv.es>) con el método un codón-un aminoácido, donde todos los codones que codifican el mismo aminoácido son substituidos por el codón sinónimo usado con mayor frecuencia en el set de referencia

(Puigbo y col, 2007). Como set de referencia se usó la tabla de *Malus doméstica* (Anexo 1) obtenida de (<http://www.kazusa.or.jp>). Para verificar el correcto marco de lectura de la construcción así como la homología aminoácídica con la secuencia del gen *psy2* de la base de datos, se utilizó el programa Vector NTI. También se usó el programa de predicción de genes FGENESH 2.6, seleccionándose en éste el ítem “organismo plantas dicotiledóneas” (<http://linux1.softberry.com>).

2.3.7.2. Diseño bio-informático: Construcción génica *pPG::pt::crtI::nos*.

Se utilizó el mismo fragmento del promotor PG descrito previamente, seguido de la secuencia del péptido de tránsito a cloroplasto de la subunidad pequeña de la Rubisco de arveja (171 pb) (ENA|CAA25390:1-171), la secuencia codificante del gen *crtI* de *X. dendrorhous* (1.749 pb) (gi.68250374) y el terminador *nos* ya descrito. La construcción se flanqueó por la enzima de restricción *XhoI*, la cual corta sólo una vez en SMC del vector de destinación (pCP), no corta ninguna de las secuencias mencionadas ni tampoco al gen *psy2* de *D. carota*. Se realizó la optimización de los codones de la secuencia del gen *crtI* como se describió previamente y se comprobó el correcto marco de lectura así como la homología aminoacídica mediante los mismos programas.

Ambas construcciones génicas fueron sintetizadas por la empresa GenScript (<http://www.genscript.com>) y clonadas en el sitio de restricción *EcoRV* del vector pUC57. Se realizaron análisis de restricción y secuenciaciones como control de calidad por parte de la misma empresa. Los plásmidos liofilizados fueron resuspendidos de acuerdo a las instrucciones del fabricante y fueron utilizados para transformar *E.coli* DH5 α como se describió en 2.2.2. Los clones positivos se seleccionaron de acuerdo a

2.2.2, se verificó la presencia del inserto mediante PCR de colonias (2.3.6.2. Tabla 4.3), luego se les extrajo ADN plasmidial (2.3.1.2.) y se realizaron digestiones enzimáticas de acuerdo a 2.3.4.2. (Tabla 2).

2.3.7.3. Obtención del vector pCP.

El vector binario pB7FWG2,0 que contiene el gen *dxr* de *A. thaliana*, fue digerido con *XbaI* y *SacI*, de acuerdo a 2.3.4.1. Esta digestión desprende un fragmento de 3.599 pb (*p35S::dxr::gfp::t35S*) y un fragmento de 7.854 pb, que contiene el borde derecho (RB), la resistencia a Basta para la selección en plantas (gen *bar*), el borde izquierdo (LB) y la resistencia a Espectinomicina para la selección en bacterias (Fig. 2). La digestión se visualizó en un gel de agarosa (2.3.2) y la banda de 7.854 pb fue purificada de acuerdo a 2.3.3. Paralelamente se sintetizaron dos oligos complementarios, que poseían los sitios de restricción que flanquean las construcciones génicas descritas en 2.3.7.1-2 (*SpeI* y *XhoI*), se seleccionaron estas enzimas ya que no cortaban las construcciones ni la banda de 7.854 pb purificada. Se añadieron otras enzimas de restricción (*EcoRI*, *ApaI*, *PstI*, *AvrII*, *EcoRV*, *BspEI*, *NcoI*, *BglII*), que no cortaban el vector digerido, para obtener un tamaño cercano a 100 pb. También se diseñaron dos partidores (Tabla 3) que flanquean todos los sitios de restricción, para futuras secuenciaciones. Toda esta construcción fue flanqueada por los sitios de restricción *XbaI* y *SacI* (Fig.2). Los dos oligos complementarios fueron hibridados en un gradiente de temperatura en el termociclador (T_i 94°C, \downarrow 1°C cada 10'', T_f 10°C), luego se digirió con *SacI-XbaI* (2.3.4.1.), se visualizó en un gel de agarosa (2.3.2.) y se purificó la banda correspondiente a 141 pb (2.3.3.). Para la ligación se tomaron 42 ng del vector y 90 ng del sitio múltiple de

clonamiento (SMC), en una razón de 1:119, con 1,5 unidades de T4 ligasa (3U/ μ l Promega), amortiguador 1X, en un volumen final de 20 μ L. Esta reacción se mantuvo a 20°C por 16 horas y fue utilizada para transformar *E.coli* DH5 α como se describió en 2.2.2. Los clones positivos se seleccionaron de acuerdo a 2.2.2, se les extrajo ADN plasmidial (2.3.1.2.) a 10 colonias y se verificó la presencia del inserto mediante PCR (2.3.6.1. Tabla 4) y mediante digestiones enzimáticas de acuerdo a 2.3.4.2. (Tabla 2).

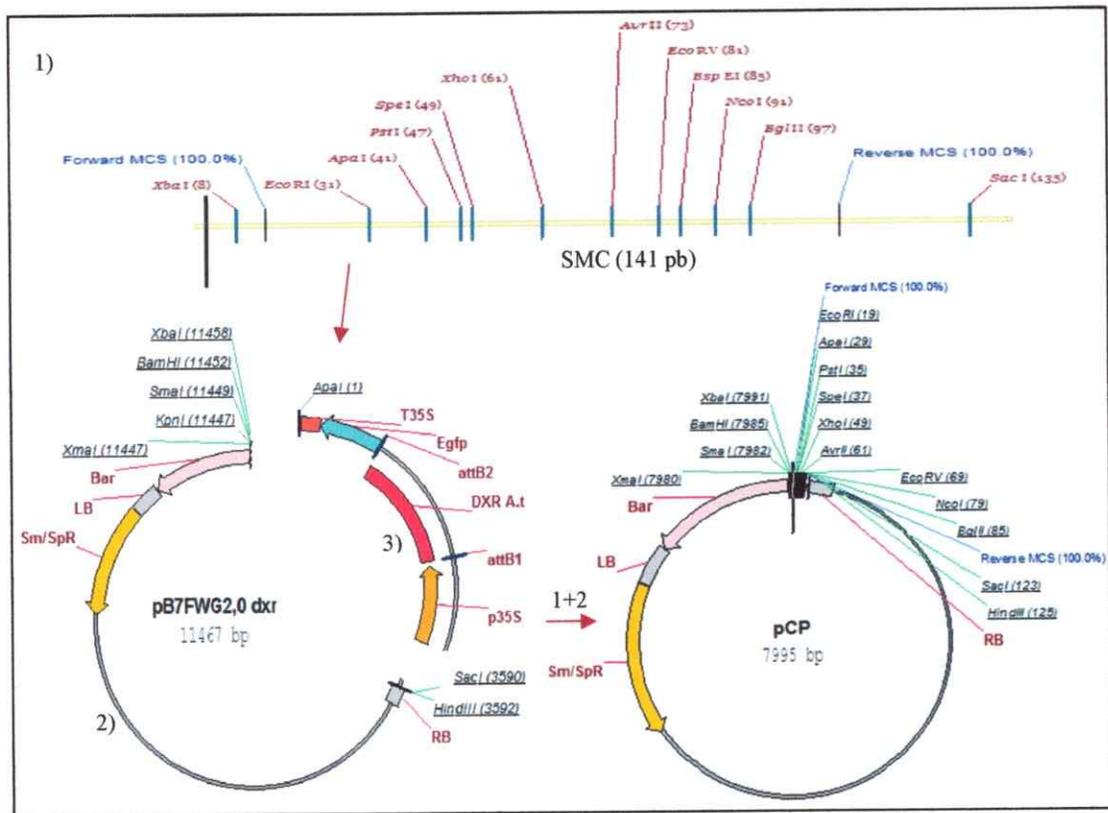


Figura 2. Obtención del vector pCP. Esquema del SMC diseñado (1), de la digestión con *XbaI-SacI* del vector pB7FWG2-*Atdxr* (2) y del vector final obtenido luego de la ligación (pCP) (1+2).

2.3.7.4. Obtención del vector pCP:*psy2*

El vector binario pCP (2.3.7.3.) fue digerido con la enzima de restricción *SpeI* de acuerdo a 2.3.4.1., a continuación se agregó 1 unidad de fosfatasa alcalina a la mezcla de digestión y se incubó a 37°C por 1 hora, luego se inactivó la enzima a 65°C por 20 min. y al agregar 2 µL EDTA 0,5 M pH=8. A continuación la digestión se visualizó en un gel de agarosa (2.3.2) y la banda de 7.995 pb fue purificada de acuerdo a 2.3.3. Paralelamente el vector pUC57:*pPG::psy2::nos* (2.3.7.1) fue digerido con la misma enzima en las mismas condiciones, se visualizó en un gel de agarosa (2.3.2) y la banda correspondiente a 2.433 pb (*pPG::psy2::nos*) fue purificada de acuerdo 2.3.3.

Para la ligación se utilizó 100 ng del vector pCP y 240 ng del inserto *pPG::psy2::nos*, en una razón de 1:7,7 con 1 unidad de T4 ligasa (Fermentas 5 u/ul), amortiguador 1X, en un volumen final de 20 µL. Esta reacción se mantuvo a 4°C por 16 horas y fue utilizada para transformar *E.coli* DH5α como se describió en 2.2.2. Los clones positivos se seleccionaron de acuerdo a 2.2.2, se les extrajo ADN plasmidial (2.3.1.2.) y se verificó la presencia del inserto mediante digestiones enzimáticas de acuerdo a 2.3.4.2. (Tabla 2). Los vectores positivos fueron posteriormente incorporados a *A. tumefaciens* (2.2.4) para proceder con la transformación vegetal.

2.3.7.5. Obtención del vector pCP:*psy2:crtI*

El vector binario pCP:*pPG::psy2::nos* (2.3.7.4.) fue digerido con la enzima de restricción *XhoI* de acuerdo a 2.3.4.1., a continuación se agregó 1 unidad de fosfatasa alcalina a la mezcla de digestión y se incubó a 37°C por 4 horas, luego se inactivó la enzima a 80°C por 20 min., se visualizó en un gel de agarosa (2.3.2) y la banda de

10.428 pb fue purificada de acuerdo a 2.3.3. Debido a múltiples intentos fallidos, se decidió re-desfosforilar el vector purificado por otras 6 horas, se inactivó la enzima a 80°C por 30 min., se visualizó en un gel de agarosa (2.3.2) y la banda de 10.428 pb fue re-purificada de acuerdo a 2.3.3.

Paralelamente el vector pUC57:pPG::pt::crtI::nos (2.3.7.2) fue digerido con la misma enzima en las mismas condiciones, se visualizó en un gel de agarosa (2.3.2) y la banda correspondiente a 3.020 pb (pPG::pt::crtI::nos) fue purificada de acuerdo 2.3.3.

Para la ligación se utilizó 96 ng del vector y 168 ng del inserto (en una razón de 1:6,5) con 200 unidades cohesivas de T4 ligasa (NEB 400 u/ul), amortiguador 1X, en un volumen final de 10 µL. Esta reacción se mantuvo a 4°C por 16 horas y fue utilizada para transformar *E.coli* DH5α como se describió en 2.2.2. Los clones positivos se seleccionaron de acuerdo a 2.2.2, se les extrajo ADN plasmidial (2.3.1.2.) y se verificó la presencia del inserto mediante digestiones enzimáticas de acuerdo a 2.3.4.2. (Tabla 2). Los vectores positivos fueron posteriormente incorporados a *A. tumefaciens* (2.2.4) para proceder con la transformación vegetal.

2.3.7.6. Tecnología Gateway®

2.3.7.6.1. Clonación de los fragmentos de interés en el vector de entrada

PCR®8

Para clonar las construcciones pPG::psy2 s/t y pPG::pt::crtI s/t se utilizó el vector de entrada pCR®8/GW/TOPO®, el que posee la enzima Topoisomerasa I unida covalentemente a la secuencia CCCTT del vector, lo que favorece la clonación de los productos de PCR que contienen una adenosina libre en el extremo 3', como es el caso

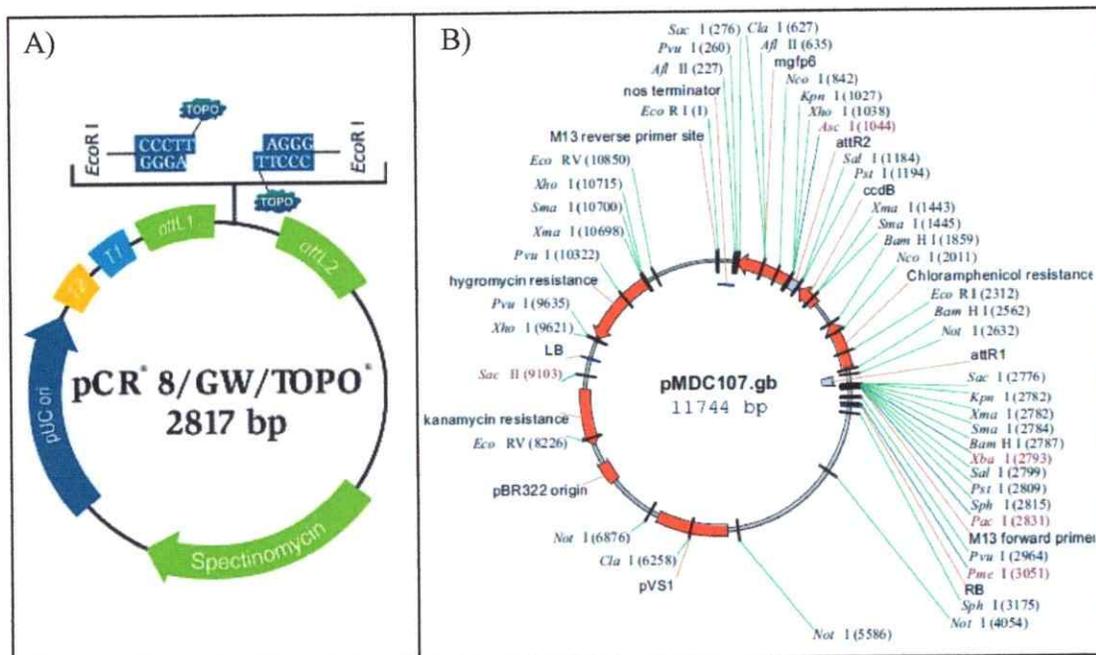
de los obtenidos mediante Taq polimerasa. Adicionalmente, pCR[®]8 posee los sitios *attL1* y *attL2* flanqueando el sitio de clonación, lo que permite posteriormente el traspaso de las secuencias clonadas a una amplia gama de vectores de destinación, mediante la tecnología Gateway[®]. Esta tecnología se basa en el mecanismo de recombinación sitio específica del fago λ , usando secuencias homólogas tanto en el vector de entrada (*attL*) como en el vector de destinación (*attB*), las que son recombinadas de forma específica mediante la enzima LR clonasa (Invitrogen), transformándose en *attB*. El gen de interés debe estar en sentido con respecto al sitio *attL1* en PCR[®]8 (Fig.3).

Para la reacción de clonación se utilizaron 2 μ L (250-300 ng) del producto de PCR *pPG::psy2* s/término y *pPG::pt::crtI* s/término (2.3.6.1.), 25 ng del vector PCR8[®], 0,5 μ L de solución salina (NaCl 1,2 M, MgCl₂ 0,06 M), en un volumen de 3 μ L. Se incubó a temperatura ambiente por 16 horas y se utilizó la mezcla para transformar *E.coli* DH5 α como se describió en 2.2.2. Los clones positivos se seleccionaron de acuerdo a 2.2.2, se les extrajo ADN plasmidial (2.3.1.2.) y se verificó la presencia y orientación del inserto mediante digestiones enzimáticas de acuerdo a 2.3.4.2. (Tabla 2).

2.3.7.6.2. Clonación de los fragmentos de interés en el vector de destinación pMDC107: Recombinación por tecnología Gateway[®]

Para el análisis de localización subcelular se eligió el vector de destinación pMDC107, el cual posee los sitios *attR1* y *attR2* flanqueando el gen de selección letal en *E.coli ccdB*, río arriba del gen reportero *gfp* fusionado a una cola de histidina. Estas secuencias se encuentran flanqueadas por los sitios LB y RB que delimitan la zona que se insertará en

el genoma de las células vegetales, al ser transformadas mediante *A. tumefaciens*. Las zonas de recombinación *attR1* y *attR2*, permiten reemplazar el gen de selección *ccdB* por los fragmentos previamente clonados entre los sitios *attL1* y *attL2* del vector PCR[®]8, generándose construcciones del tipo *pPG::psy2::gfp* y *pPG::pt::crtI::gfp*. Para la reacción de recombinación se usaron 120-150 ng del vector PCR[®]8/*pPG::psy2* o PCR[®]8/*pPG::pt::crtI*, 150 ng del vector pMDC107, 2 µL enzima LR Clonasa[™] II y tampón TE, pH: 8 hasta un volumen final 10 µL. Se incubó la reacción a 25°C por 16 horas, luego se agregó 1 µL de proteinasa K y se incubó la mezcla a 37°C por 10 min. Se utilizó la mezcla para transformar *E.coli* DH5α como se describió en 2.2.2. Los clones se seleccionaron de acuerdo a 2.2.2, se les extrajo ADN plasmidial (2.3.1.2.) y se verificó la presencia y orientación del inserto mediante digestiones enzimáticas de acuerdo a 2.3.4.2. (Tabla 2). Los vectores positivos fueron posteriormente incorporados a *A. tumefaciens* (2.2.4) para proceder con la transformación vegetal.



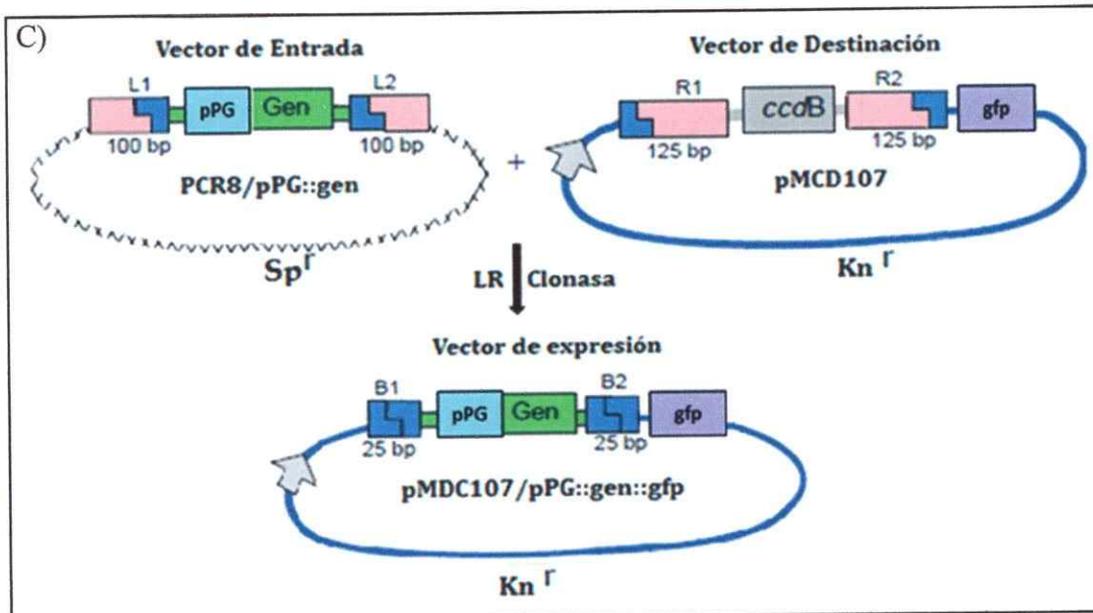


Figura 3. Mecanismo de recombinación mediante la tecnología Gateway. A: Mapa del vector de entrada PCR8 (<http://www.invitrogen.com>). B: Mapa del vector de destino pMDC107 (<http://www.arabidopsis.org>). C: Esquema de la recombinación homóloga entre los sitios *attL* del vector de entrada y *attB* del vector de destino, dando origen al vector binario con el gen de interés.

2.3.8. Transformaciones transitorias de los frutos.

Para los ensayos de agroinfiltración se seleccionaron frutos de *Solanum lycopersicum* inmaduros que presentaban una coloración verdosa/amarilla y un epicarpio resistente a la presión. También se seleccionaron frutos de *Malus domestica* variedad Fuji, con una coloración amarilla, indicativo de una maduración media. Todos los frutos fueron adquiridos comercialmente.

Los clones de *A. tumefaciens* portadoras de los vectores pCP, pCP:*psy2* y pCP:*psy2:crtI* fueron crecidos en 15 mL de LB liq. suplementados con los antibióticos de selección (2.2.4.) a 28°C en agitación, hasta alcanzar una D.O._{600nm} = 0,8. Luego se centrifugó (7'x 3.500 rpm), se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en medio de infiltración MMA (0,5 X MS, 10 mM MES pH:5,6, 20 g/L de sacarosa, 200 µM acetosiringona). Esta mezcla se incubó por 1 hora a T° ambiente en agitación y se

inyectaron 500 μ L de esta solución usando jeringas BD ultra-fine™ II en frutos de tomate y manzana, entre 6-8 regiones por fruto.

Se transformaron entre tres a cinco frutos por cada una de las construcciones analizadas. Como control negativo se transformó con *A. tumefaciens* portadoras del vector pCP sin inserto. Los frutos se mantuvieron a 22°C con un fotoperiodo de 16 hrs. luz, por 3-5 días, luego del cual se les extrajo ARN (2.3.9).

2.3.9. Extracción, visualización y cuantificación del ARN de los frutos.

2.3.9.1. Extracción del ARN de los frutos de tomate.

Se esterilizaron los morteros preñiendo etanol y se limpió bien las pipetas y los utensilios (cucharón, pinzas) con etanol. Se utilizaron puntas y tubos recién autoclavados durante todo el proceso. Se molieron 800 mg de mesocarpo de tomate agroinfiltrados con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino, luego se agregó 3 mL de amortiguador de extracción (0,2 M LiCl, 200 mM Tris-HCl pH:8, 20 mM EDTA, 2% SDS p/v) y 3 mL de Fenol básico pH:8 previamente pre-calentados a 65°, posteriormente se agregó 2% v/v de β -mercaptoetanol sobre el tejido congelado. Se recolectó el líquido descongelado en 4 tubos de 2 mL, se mezcló en vortex por 1 min y se incubó a 65°C por 30 min., cuidando de homogenizar constantemente (vortex c/5 min.). Se agregó 400 μ L de Cloroformo-Acohol Isoamílico (24:1), se agitó por vortex y se centrifugó (20'x12.000g a 4°C). Se recuperó la fase acuosa (750 μ L), se agregó 1 volumen de Cloroformo-Acohol Isoamílico y se repitió el paso anterior. Se extrajo la fase acuosa (600 μ L) a un nuevo tubo de Eppendorf, se juntaron dos de las 4 réplicas, se agregaron 0,25 volúmenes de LiCl 10 M y se precipitó a 4°C por toda la noche. Se

centrifugó a (35'x12.000g a 4°C), se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 250 µL de H₂O DEPC. Luego se agregó un volumen de Cloroformo-Acohol Isoamílico (24:1), se mezcló, se centrifugó (10'x14.000g a 4°C), se recuperó la fase acuosa (200 µL) a un nuevo tubo y se unieron las dos réplicas restantes, se agregaron 2 volúmenes de isopropanol (800 µL) y se dejó precipitar a -20°C por 60 min. A continuación se centrifugó (20'x14.000g a 4°C), se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 mL EtOH 75% DEPC, se centrifugó (10'x14.000g a 4°C), se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 250 µL de H₂O DEPC. Luego se agregó un volumen de cloroformo, se mezcló y se centrifugó (5'x10.000g a 4°C), se rescató el sobrenadante, se agregaron 3 volúmenes de EtOH absoluto y frío más 0,1 volúmenes de NaAc 3M pH:4,8 frío y se dejó precipitar a -80°C por 1 hora. A continuación se centrifugó (45'x10.000g a 4°C), se eliminó el sobrenadante, se lavó el precipitado nuevamente con EtOH 75% y se centrifugó (5'x10.000g a 4°C). Finalmente se eliminó el sobrenadante y se secó el precipitado a T° ambiente, para resuspenderlo en 15 µL de H₂O DEPC. Se almacenó a -80°C hasta su uso. Protocolo basado en (Araya, 2011) modificado de (Verwoerd y col, 1989).

2.3.9.2. Extracción del ARN de los frutos de manzano

Utilizando un mortero, se molieron 4g de mesocarpo de manzana en presencia de nitrógeno líquido y se agregaron 10 mL de amortiguador de extracción (2% p/v CTAB, 2% p/v PVP40, EDTA 25 mM, NaCl 2M, Tris-HCl 100mM pH:8.0) precalentados a a 65°C, posteriormente se agregó 2% v/v de β-mercaptoetanol sobre el tejido congelado. Se recolectó el líquido descongelado en un tubo Falcon de 50 mL, se agitó por 1 min. en vortex y se incubó a 65°C por 30 min., cuidando de homogenizar constantemente

(vortex c/5 min.). Luego se agregó un volumen de Cloroformo-Acohol Isoamílico frío (24:1), se agitó por vortex por 1 min. y se centrifugó (20'x12.000g a 4°C). Se recuperó el sobrenadante, se traspasó a un nuevo tubo y se repitió el paso anterior. A continuación, se traspasó el sobrenadante a un tubo Falcon de 15 mL, se agregaron 0,25 volúmenes de LiCl 10 M, se mezcló y se dejó precipitando a -20°C por toda la noche. Luego se centrifugó (35' x12000g a 4°C), se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 500 µL de H₂O DEPC, transfiriéndose a un tubo Eppendorf. Se repitió el lavado con Cloroformo-Acohol Isoamílico, se recuperó la fase acuosa (450 µL) y se agregó 1 mL EtOH 75% DEPC y se dejó precipitar a -80°C durante 30 min.. Finalmente se centrifugó (20'x14000g a 4°C), se eliminó el sobrenadante y se secó el precipitado a temperatura ambiente, para resuspenderlo en 15 µL de H₂O DEPC. Se almacenó a -80°C hasta su uso. Protocolo basado en (Meisel y col, 2005).

2.3.9.3. Visualización y Cuantificación del ARN mediante geles de agarosa denaturantes.

Se tomaron 0,5 gr. de agarosa en 36 mL de agua y se calentaron hasta disolver, luego se enfrió hasta 60 °C y se agregó 5 mL de amortiguador de MOPS 10X (0,4 M MOPS pH:7, 0,1 M AcNa y 0,01 M EDTA) y 9 mL de formaldehído 37% (12,3 M). Se mezcló, se vertió el contenido en el molde y una vez seco se depositó en la cámara de electroforesis añadiendo 250 mL de amortiguador de corrida MOPS 1X. Para preparar las muestras se tomaron 2 µL de ARN obtenido (2.3.9.1-2.) y 2 µL del amortiguador de tinción de carga de formaldehído con BrEt, en una razón 1:1, se mezcló y se calentó a 65°C entre 5-10 min. Finalmente se cargó el gel y se corrió a voltaje constante de 75 mV por 45 min, para posteriormente visualizarlo en el transiluminador UV (GeneGenius

Classic de SynGene). Para verificar la integridad del ARN obtenido se fijó en la presencia de las bandas 28S y 18S. El ARN fue cuantificado usando un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis) (A_{260}), fijándose en que los índices $A_{280/260}$ y $A_{260/230}$ dieran dentro del rango (1,8 a 2 y 2 a 2,2 respectivamente).

2.4. Microscopía de epifluorescencia

Para determinar la correcta localización subcelular de las proteínas PSY2 y PT::CRTI, se visualizó la fluorescencia de las proteínas fusionadas a GFP, para esto se agroinfiltraron frutos de tomate con los vectores pMDC107:psy2::gfp y pMDC107:pt::crtI::gfp (2.3.7.6.2). Se utilizó un vibrátomo para realizar cortes muy finos (200-300 μm) del tejido de fruto y se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX70) utilizando una longitud de onda 460-490 nm (luz azul, requerida para excitar a GFP) con un aumento de 200 veces (20X). Se utilizó el filtro U-N31001 para observar la fluorescencia de GFP (verde) y eliminar la autofluorescencia de la clorofila, así como un filtro U-MNG2 para observar la fluorescencia de la clorofila (fluorescencia roja). Como control negativo se utilizaron muestras agroinfiltradas con pMDC107 sin inserto y pCambia1302:ppG::gfp. Los experimentos se realizaron tres veces, para pMDC107:psy2::gfp y dos veces para pMDC107:pt::crtI::gfp, observándose 15-20 cortes cada vez, para cada vector.

3. RESULTADOS

3.1. Obtención del vector pCP

El vector pB7FWG2.0-*Atdxr* se transformó en *E. coli*, seleccionándose las colonias con espectinomicina (100 mg/L). La presencia del vector se ratificó mediante PCR de colonias con los partidores específicos para el gen *dxr* de *A. thaliana* fusionado al gen *gfp* (Tabla 3). Los resultados de la amplificación se observan en el gel de electroforesis con la banda esperada de 705 pb, para las cinco colonias analizadas (Fig. 4).



Figura 4. PCR de colonias del vector pB7FWG2.0-*Atdxr*. Amplificación de un fragmento del gen *dxr* de *A. thaliana* fusionado en el extremo 3' al gen *egfp* a partir de colonias de *E. coli* portadoras del vector pB7FWG 2.0-*Atdxr*. Control negativo: Mezcla de amplificación sin templado (C-).

Luego, se digirió el ADNp de las colonias positivas con las enzimas *SacI* y *XbaI*. Mediante electroforesis se observaron las dos bandas esperadas de 7.868 pb (RB, *bar*, LB y Sp^R) y 3.599 pb (p35S::*Atdxr*::*gfp*::*t35S*) (Fig. 5A). A continuación, se purificó la banda con el vector lineal de interés (7.868 pb), comprobándose su correcta purificación mediante electroforesis (Fig. 5B).

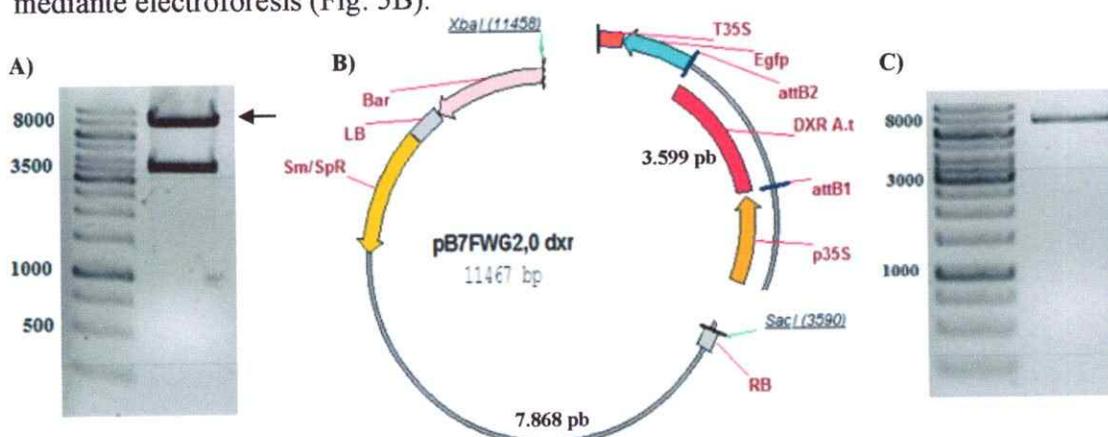


Figura 5. Digestión *SacI*-*XbaI* del vector pB7FWG2.0-*dxr* y purificación del fragmento de interés. A) Digestión con *SacI*-*XbaI* del vector pB7FWG2-*dxr*. B) Esquema de los fragmentos esperados de la digestión con *SacI*-*XbaI* del vector pB7FWG2-*dxr*. C) Purificación de la banda de 7.868 pb (RB::*bar*::LB-Sp^R).

Paralelamente, se sintetizaron e hibridaron por un gradiente de temperatura dos oligos complementarios de 141 pb (2.3.7.3), para generar un sitio múltiple de clonamiento, SMC que contiene los sitios: *EcoRI*, *ApaI*, *PstI*, *SpeI*, *XhoI*, *AvrII*, *EcoRV*, *BspEI*, *NcoI*, *BglII*, flanqueado por los sitios de restricción *SacI* y *XbaI*. Se digirió el SMC obtenido, con las enzimas *SacI-XbaI* y se observó la banda de 141 pb esperada por electroforesis (Fig. 6A). Luego se purificó la banda de interés y se corroboró su adecuada purificación mediante electroforesis (Fig. 6B).

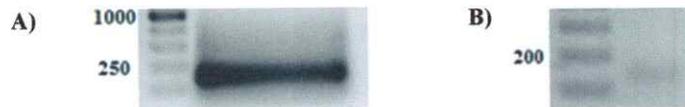


Figura 6. Digestión *SacI-XbaI* del SMC y purificación del fragmento de interés. A) Digestión con *SacI-XbaI* del SMC luego de la hibridación de los dos oligos complementarios sintetizados. B) Purificación de la banda de 141 pb.

Para obtener el vector pCP, la banda correspondiente al vector pB7FWG 2.0-*Atdxr* (7.854 pb) y el SMC (141 pb) purificados, se ligaron mediante T4 DNA-ligasa y se clonaron en *E. coli* DH5 α . Las colonias positivas se seleccionaron con el antibiótico de selección correspondiente (Espectinomicina) y se comprobó la presencia del SMC en 9 de las 10 colonias analizadas mediante PCR, usando partidores específicos para el SMC (Tabla 3) (Fig. 7).



Figura 7. PCR del SMC del vector pCP. Amplificación del SMC usando partidores específicos que flanquean los sitios de restricción y ADNp de 10 colonias de *E. coli* transformadas con el vector de interés resistentes a Sp. Control negativo: Mezcla de reacción sin templado (C-).

Luego, se seleccionaron las colonias positivas 6, 8 y se comprobó la presencia de los sitios de restricción de interés (*SpeI* y *XhoI*) mediante digestiones enzimáticas dobles con *NheI-SpeI* (Fig. 8A) y *NdeI-XhoI* (Fig. 8B). En las dos colonias analizadas se

obtuvieron los patrones de digestión esperados para la presencia del SMC, con tamaños de (4.469-3.262-264) pb y (3.711-2.489-1795) pb respectivamente (Fig. 8 C).

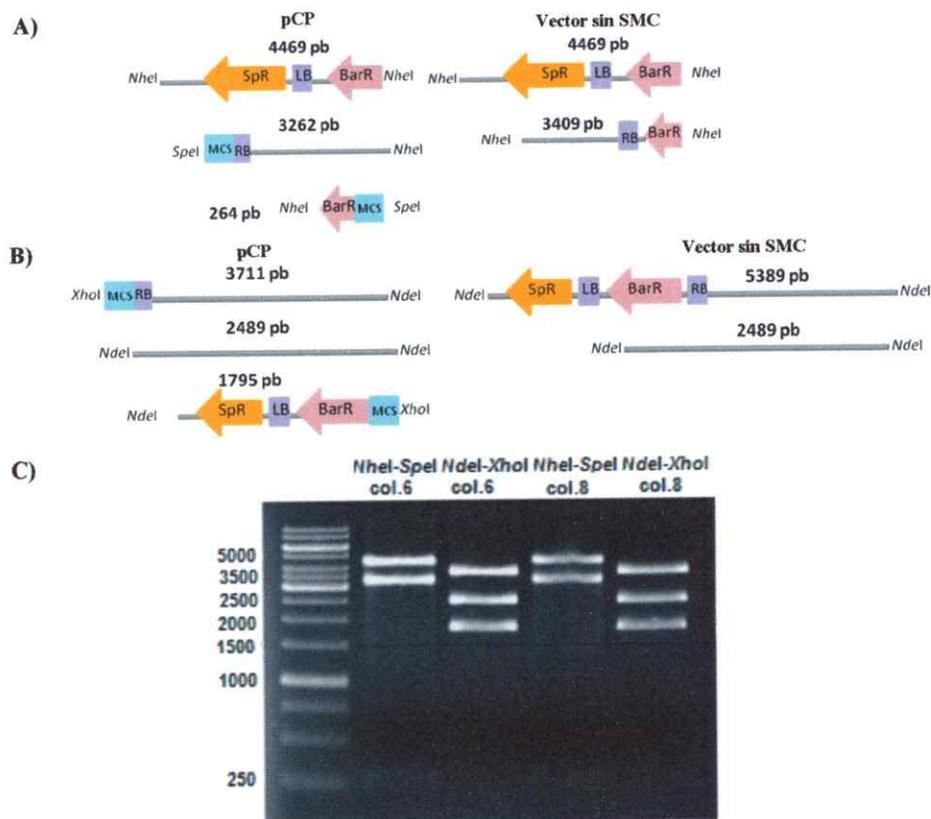


Figura 8. Digestión del vector pCP con *NheI-SpeI* y *NdeI-XhoI*. A) Izquierda: Mapa del vector pCP digerido con *NheI-SpeI*. Derecha: Mapa del vector sin el SMC, digerido con *NheI-SpeI*. B) Izquierda: Mapa del vector pCP digerido con *NdeI-XhoI*. Derecha: Mapa del vector sin el SMC digerido con *NdeI-XhoI*. C) Gel de electroforesis donde se ilustra dos colonias digeridas con *NheI-SpeI* y *NdeI-XhoI*.

3.2. Obtención de las construcciones génicas pCP:*psy2* y pCP:*psy2:crtI*

3.2.1. Diseño bioinformático de las construcciones génicas pPG::*psy2::nos* y pPG::*pt:crtI::nos*

Mediante el programa Vector NTI se diseñaron dos construcciones, que poseen el promotor del gen de la Poligalacturonasa de tomate (pPG), seguido del gen *psy2* de *D.carota* fusionado al terminador Nos o el péptido de tránsito a cloroplasto de la subunidad pequeña de la Rubisco de arveja fusionado al gen *crtI* de *X. dendrorhous*,

seguido del terminador Nos. Estas construcciones, fueron flanqueadas por las enzimas *SpeI* y *XhoI*, presentes en el vector pCP. En la figura 9 se muestran las construcciones diseñadas.

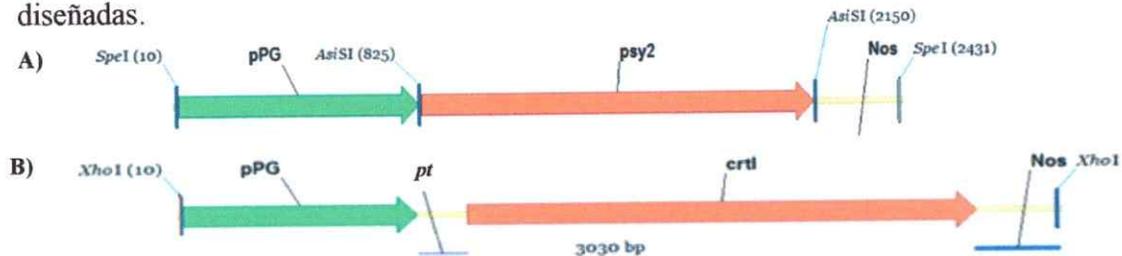
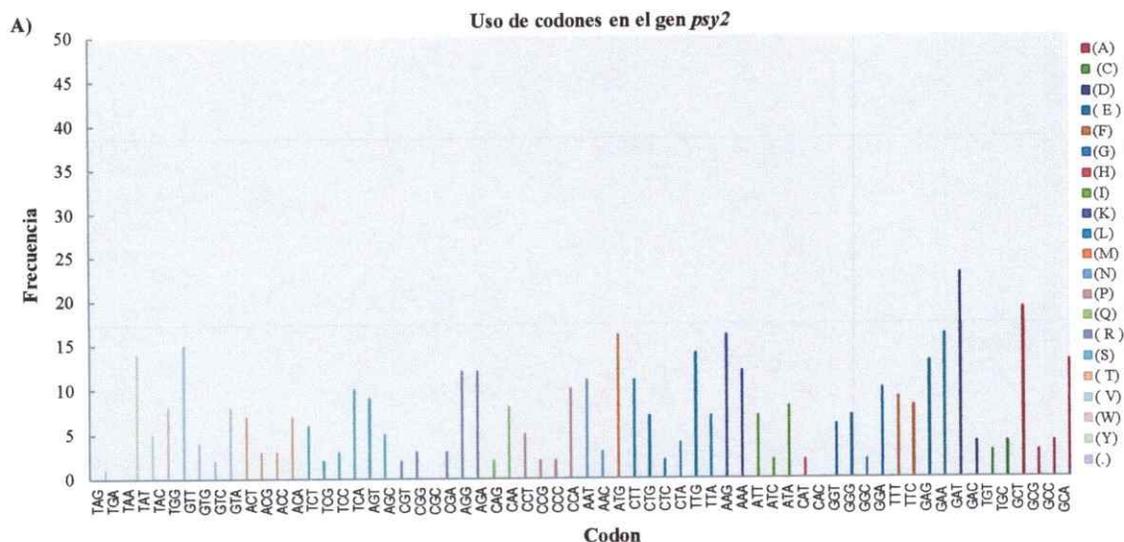


Figura 9. Construcciones genéticas que permitirán la expresión fruto específica de los genes *psy2* de *D.carota* y *crtI* de *X.dendrorhous*. A) Ilustración que muestra la construcción de 2.443 pb diseñada para el gen *psy2* de *D.carota*. B) Ilustración que muestra la construcción de 3.030 pb diseñada para el gen *crtI* de *X. dendrorhous*. pPG: promotor de la poligalacturonasa de tomate, *psy2*: fitoeno sintasa 2 de *D.carota*, *pt*: péptido de tránsito a cloroplasto de la subunidad pequeña de la Rubisco de arveja, *crtI*: fitoeno desaturasa de *X.dendrorhous*, Nos: extremo 3'UTR del gen nopalina sintasa de *A. tumefaciens*.

Las secuencias nucleotídicas del gen *psy2* y del gen *crtI*, fueron optimizadas al uso de codones de *M. domestica* mediante el programa Optimizer, por ejemplo el aminoácido Gln (Q) en *D. carota* esta codificado por el codón CAA, mientras que en *M. domestica* por el CAG. Para el gen *psy2* (1.317 nucleótidos) se obtuvieron 1.011 igualdades, 168 transiciones y 138 transversiones. Por otro lado, para el gen *crtI* (1.749 nucleótidos) se obtuvieron 1.349 igualdades, 211 transiciones y 189 transversiones (Figura 10).



A continuación, se predijeron *in silico* los potenciales genes presentes en las construcciones diseñadas, usando el programa FGENESH 2.6 y el genoma de *A. thaliana* (dicotiledónea) como base de referencia. En ambas construcciones se encontró un único marco de lectura que correspondía al CDS del gen *psy2* y del *pt* fusionado al gen *crtI*, además se encontró un único sitio de inicio de la transcripción y de señal de poliadenilación, en los lugares esperados (Fig. 11). Estos potenciales genes codificaban para las dos proteínas descritas, lo que se verificó por alineamiento de los aminoácidos entre la proteína predicha por el programa FGENESH y la proteína PSY2 de *D. carota* y PT::CRTI de *X. dendrorhous* (Anexo 2 y 3).

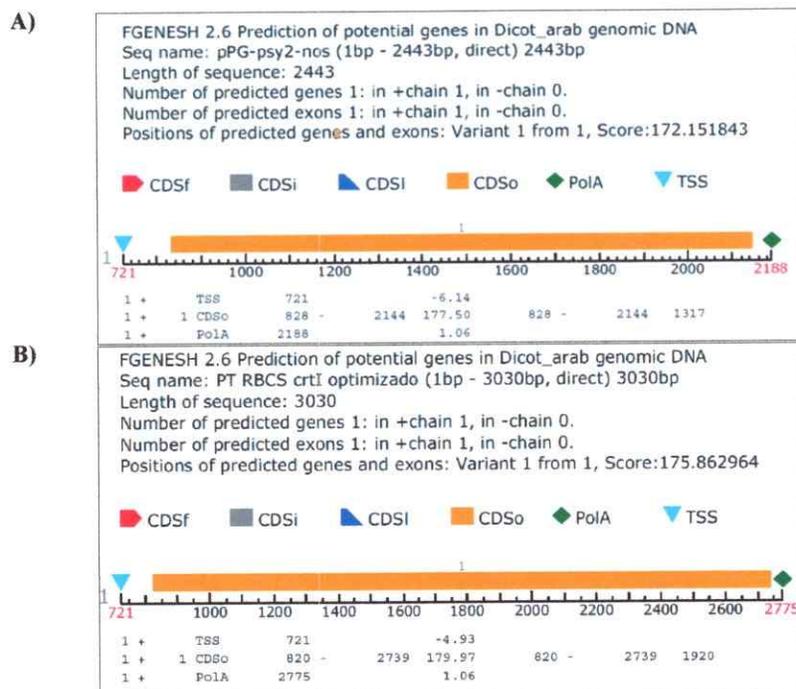


Figura 11. Predicción de los potenciales genes presentes en las construcciones *pPG::psy2::nos* y *pPG::pt::crtI::nos*. A) Ilustración donde se observa el potencial gen codificado en la construcción *pPG::psy2::nos*. B) Ilustración donde se observa el potencial gen codificado en la construcción *pPG::pt::crtI::nos*. CDSf: secuencia codificante comienza con el codón de inicio; CDSi: exón interno; CDS1: gen termina con el codón de término; CDS0: gen contiene solamente el único exón codificante, Sitio de inicio de la transcripción (TSS), Señal de poliadenilación (PolA). Score: Log de la probabilidad*10 del motivo.

Finalmente, se sintetizaron ambas construcciones en GeneScript y se recibieron clonadas en el vector pUC57. Se analizaron las secuencias de las construcciones sintetizadas, donde se verificó la integridad de éstas y la perfecta correlación de ellas con las secuencias originales.

3.2.2. Obtención del vector pCP:psy2

Se transformó la construcción pUC57:pPG::psy2::nos en *E.coli* DH5 α , se seleccionó con ampicilina (100 mg/L) y se corroboró la presencia del inserto mediante PCR de colonias con los partidores específicos para el gen *psy2* de *D. carota* optimizado (Tabla 3). En todas las colonias analizadas se observó la presencia de la banda de interés de 1.090 pb (Fig. 12).

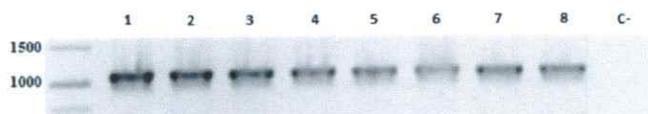


Figura 12. PCR de colonias del gen *psy2* de *D. carota* optimizado en pUC57. Amplificación del gen *psy2* optimizado a través de un PCR de colonias de *E.coli* portadoras del vector pUC57:pPG::psy2::nos. Control negativo: Mezcla de reacción sin templado (C-).

Luego, se realizaron ensayos de restricción con la enzima *Bam*HI en dos colonias analizadas, donde se observaron las dos bandas del tamaño esperado: 3.629 y 1.524 pb, lo que corrobora la presencia de la construcción pPG::psy2::nos (Fig. 13).

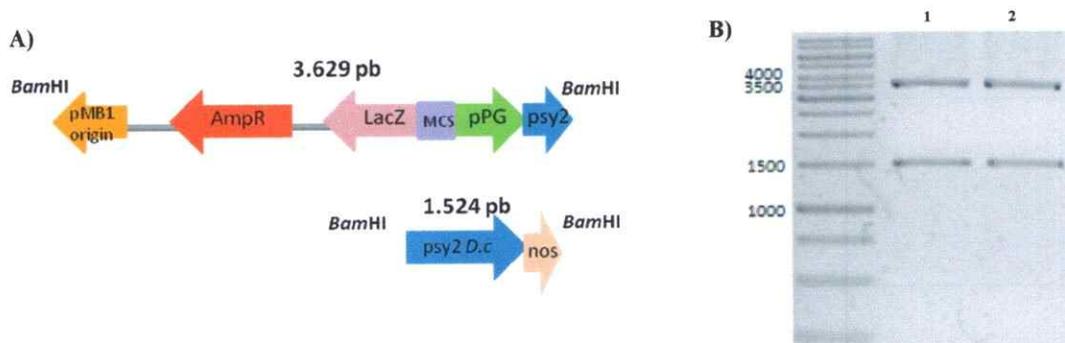


Figura 13. Digestión con *Bam*HI del vector pUC57:pPG::psy2::nos. A) Mapa de restricción donde se ilustran las dos bandas esperadas luego de la digestión con *Bam*HI del vector pUC57 portador de la construcción pPG::psy2::nos. B) Gel de electrophoresis del ADNp de dos colonias de *E.coli* transformadas con el vector de interés y digeridas con *Bam*HI.

Después de comprobar la presencia de la construcción de interés, se procedió a digerir con *SpeI* el vector pUC57:*pPG::psy2::nos*, donde se observaron las dos bandas esperadas, una que comprendía la construcción de interés (2.433 pb) y otra que correspondía al vector pUC57 (2.720 pb) (Fig. 14A). Se purificó la banda de interés y se visualizó en un gel de agarosa donde se comprobó su adecuada purificación (Fig. 14B).

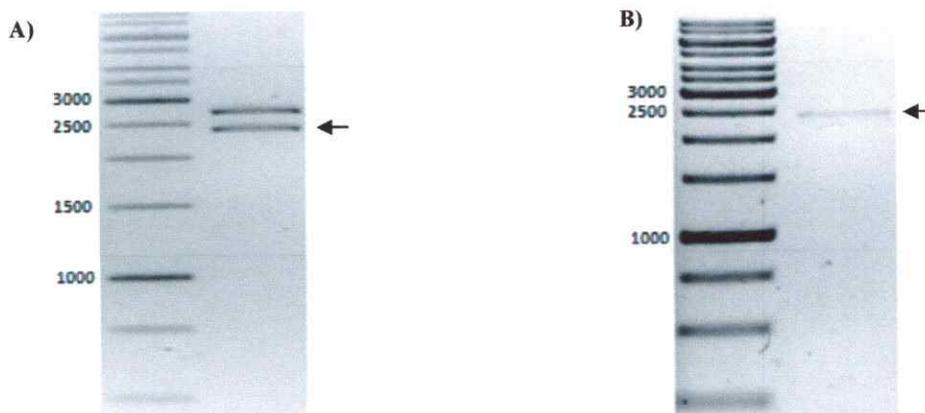


Figura 14. Digestión del vector pUC57:*pPG::psy2::nos* con *SpeI* y purificación de la banda de interés. A) Gel de electroforesis donde se observa el vector pUC57:*pPG::psy2::nos* digerido con *SpeI*. B) Gel de electroforesis donde se observa la purificación de la banda *pPG::psy2::nos* de 2.500 pb.

Paralelamente, el vector pCP (3.1.) se digirió con la enzima *SpeI*. En la Fig. 15A se observó una completa linearización de éste, con una banda de aproximadamente 7.854 pb. La banda de interés se purificó y se visualizó en un gel de agarosa, comprobándose su completa purificación (Fig. 15 B).

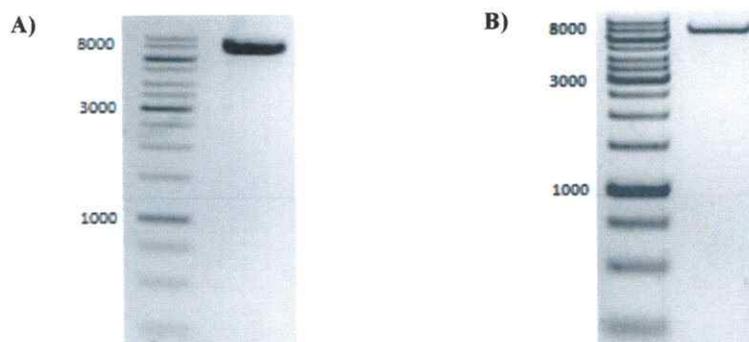


Figura 15. Digestión y purificación del vector pCP con *SpeI*. A) Gel de electroforesis donde se observa la digestión del vector pCP con *SpeI*. B) Gel de electroforesis donde se observa la purificación de la banda de interés.

Finalmente, la construcción *pPG::psy2::nos* digerida con *SpeI* se ligó mediante T4-ADN ligasa al vector pCP linearizado con *SpeI*, se transformó *E.coli* DH5 α , se seleccionó con espectinomicina y se comprobó la presencia del inserto con digestiones enzimáticas con la enzima *HindIII*. En las tres colonias analizadas se observó el patrón de digestión correspondiente a la construcción clonada en el vector pCP con una banda de 8.758 y 1.658 pb. (Fig. 16)

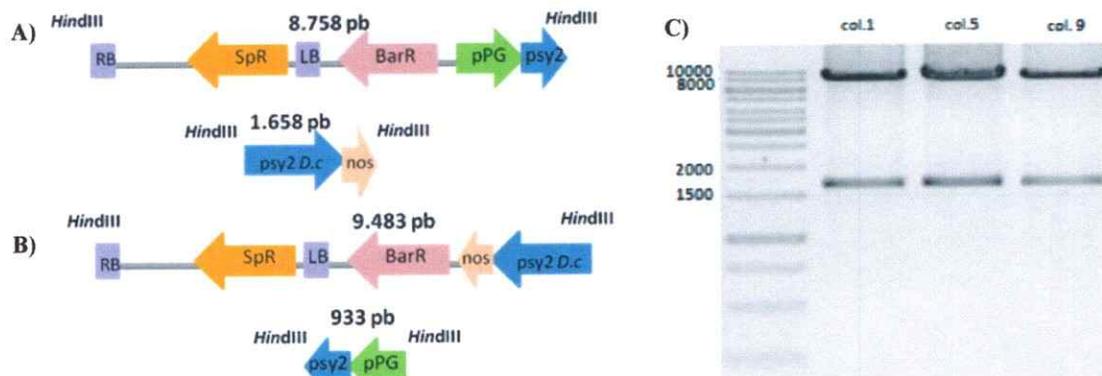


Figura 16. Digestión del vector pCP:pPG::psy2::nos con *HindIII*. A) Mapa de restricción del vector pCP con la construcción *pPG::psy2::nos* clonada en sentido, digerido con *HindIII*. B) Mapa de restricción del vector pCP con la construcción *pPG::psy2::nos* clonada en antisentido, digerido con *HindIII*. C) Gel de electroforesis del ADNp de tres colonias de *E.coli* transformadas con el vector de interés, digeridas con *HindIII*, que muestran la direccionalidad en sentido respecto al gen *bar*.

Finalmente, el vector binario pCP:pPG::psy2::nos (pCP:psy2) fue transformado en *A. tumefaciens* por golpe de frío, se seleccionó con espectinomicina (100 mg/L), más gentamicina (50 mg/L) y rifampicina (10 mg/L). Se corroboró la presencia del vector por PCR de colonias con los partidores específicos para el gen *psy2* de *D. carota* optimizado (Tabla 3). En todas las colonias analizadas se observó la banda esperada de 1.090 pb.

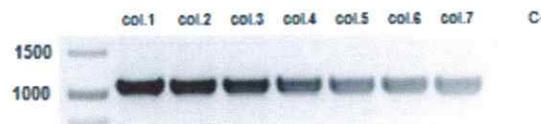


Figura 17. PCR de colonias de *Agrobacterium* portadoras del vector pCP:psy2. Amplificación del gen *psy2* optimizado a través de un PCR de colonias de *A.tumefaciens* portadoras del vector pCP:psy2. Como control positivo (C+) se usó ADNp y como control negativo (C-) la mezcla de reacción sin templado.

3.2.3. Obtención del vector pCP:psy2:crtI

Se transformó la construcción pUC57:pPG::pt::crtI::nos en *E.coli* DH5 α , se seleccionó con ampicilina (100 mg/L) y se corroboró la presencia del inserto mediante PCR de colonias con los partidores específicos para el *pt* fusionado al gen *crtI* de *X.dendrorhous* optimizado (Tabla 3), en 8 de las colonias analizadas se observó la presencia de la banda esperada de 1.324 pb (Fig. 18).

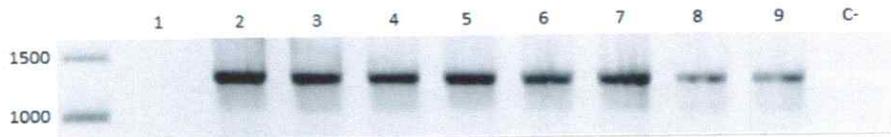


Figura 18. PCR de colonias del *pt* fusionado al gen *crtI* de *X. dendrorhous* optimizado en pUC57. Amplificación del *pt* fusionado al gen *crtI* optimizado a través de un PCR de colonias de *E.coli* portadoras del vector pUC57:pPG::pt::crtI::nos. Control negativo (C-): mezcla de reacción sin templado.

A continuación, se realizaron ensayos de restricción con la enzima *KpnI* en tres colonias seleccionadas, en las cuales se observaron las dos bandas del tamaño esperado: 4.054 y 1.688 pb, lo que corrobora la presencia de la construcción pPG::pt::crtI::nos (Fig. 19).

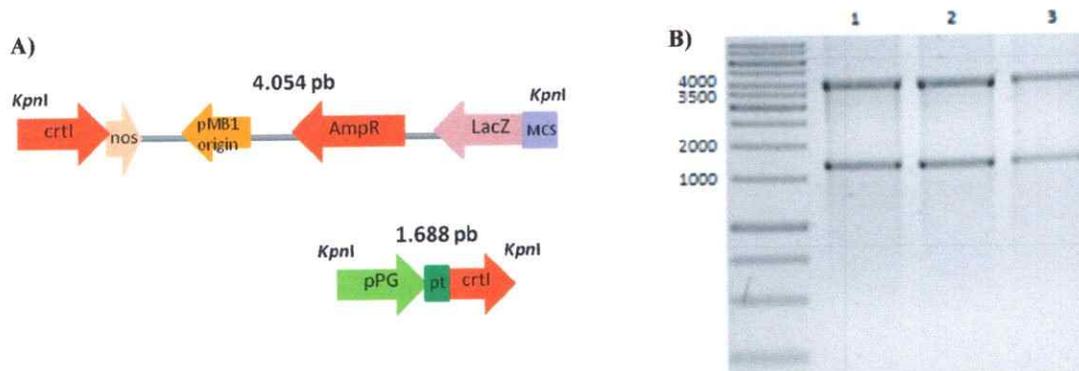


Figura 19. Digestión con *KpnI* del vector pUC57:pPG::pt::crtI::nos. A) Mapa de restricción donde se ilustran las dos bandas esperadas luego de la digestión con *KpnI* del vector pUC57 portador de la construcción pPG::pt::crtI::nos. B) Gel de electrophoresis del ADNp de tres colonias de *E.coli* transformadas con el vector de interés y digeridas con *KpnI*.

Luego de comprobar la presencia de la construcción de interés, se procedió a digerir con *XhoI* el vector pUC57: pPG::pt::crtI::nos, donde se observaron las dos bandas

esperadas, una que comprendía la construcción de interés (3.020 pb) y otra que correspondía al vector pUC57 (2.720 pb) (Fig. 20A). Se purificó la banda de interés y se visualizó en un gel de agarosa verificándose su correcta purificación (Fig. 20B).

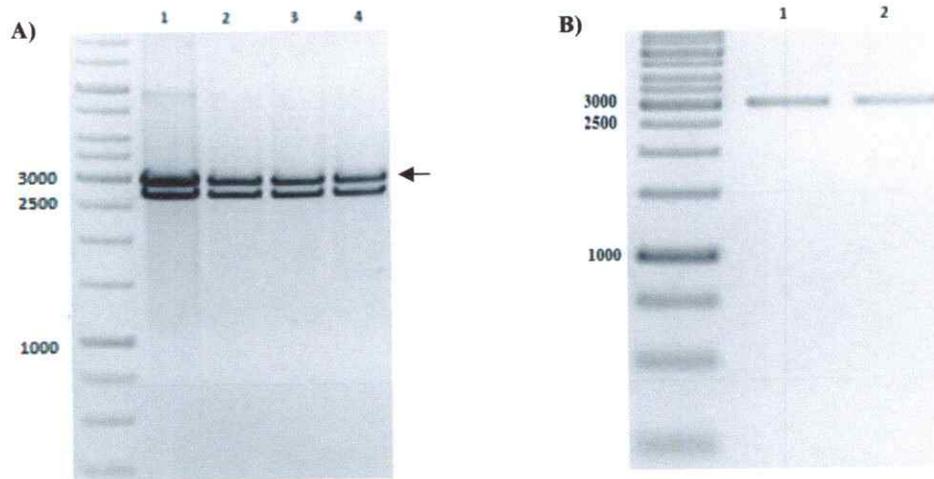


Figura 20. Digestión del vector pUC57:pPG::pt::crtI::nos con *XhoI* y purificación de la banda de interés. A) Gel de electroforesis donde se observa el vector pUC57:pPG::pt::crtI::nos digerido con *XhoI*. B) Gel de electroforesis donde se observa la purificación de la banda pPG::pt::crtI::nos.

Paralelamente, el vector pCP:psy2 (3.2.1.) se digirió con la enzima *XhoI*. En la Fig. 21A se puede observar una completa linearización de éste, apreciándose una banda de aproximadamente 10.416 pb, la cual se purificó y se visualizó en un gel de agarosa, comprobándose su completa integridad.

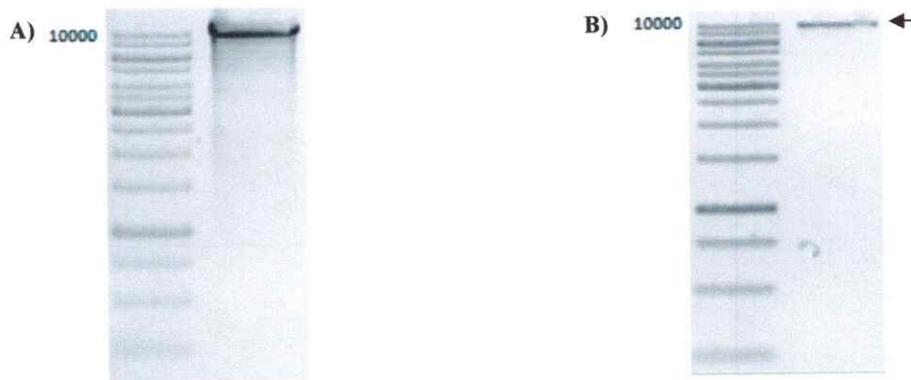


Figura 21. Digestión y purificación del vector pCP:psy2 con *XhoI*. A) Gel de electroforesis donde se observa la digestión del vector pCP:psy2 con *XhoI*. B) Gel de electroforesis donde se observa la purificación de la banda de interés.

La construcción *pPG::pt::crtI* nos digerido con *XhoI* se ligó en el vector *pCP::psy2* digerido con *XhoI*, mediante T4-ADN ligasa, se transformó *E.coli* DH5 α , se seleccionó con espectinomicina (100 mg/L) y se comprobó la presencia del inserto con digestiones enzimáticas usando la enzima *BstEII* en las dos colonias obtenidas. En la colonia 1 se observaron las bandas para la construcción clonada en antisentido respecto de la construcción de *psy2* (7.059-3.846-2.519 pb), mientras que en la colonia dos se observaron las tres bandas esperadas para una clonación en sentido respecto a la orientación de la construcción de *psy2* (7.906-3.846-1.672 pb).

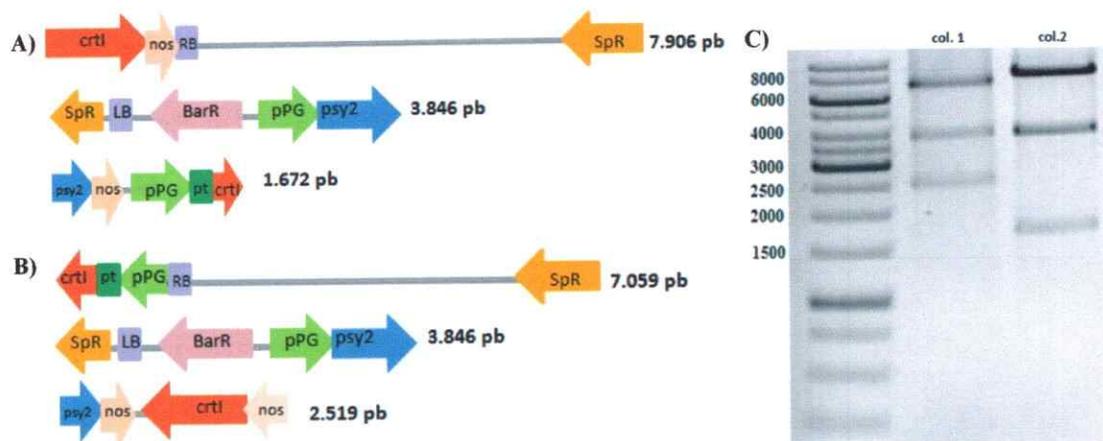


Figura 22. Digestión del vector *pCP::pPG::psy2::nos-pPG::pt::crtI::nos* con *BstEII*. A) Mapa de restricción del vector *pCP* con la construcción *pPG::pt::crtI::nos* clonada en sentido de la construcción *psy2*, digerido con *BstEII*. B) Mapa de restricción del vector *pCP* con la construcción *pPG::pt::crtI::nos* clonada en antisentido, digerido con *BstEII*. C) Gel de electroforesis del ADNp de dos colonias de *E.coli* transformadas con el vector de interés, digeridas con *BstEII*.

Finalmente, el vector binario *pCP::pPG::psy2::nos-pPG::pt::crtI::nos* (*pCP::psy2::crtI*) fue transformado en *A. tumefaciens* por golpe de frío, se seleccionó espectinomicina (100 mg/L), más gentamicina (50 mg/L) y rifampicina (10 mg/L). Se corrobó la presencia del vector mediante PCR de colonias con los partidores específicos para el gen *crtI* de *X. dendrorhous* optimizado (Tabla 3). En todas las colonias analizadas se observó la banda esperada de 1.324 pb (Fig. 23)

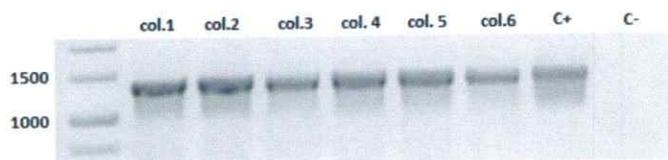
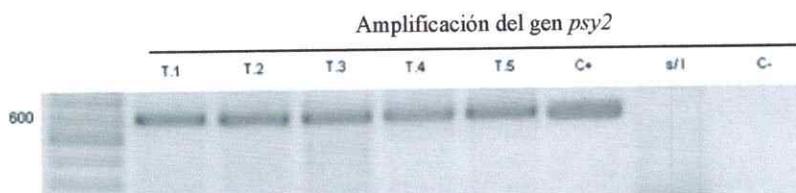


Figura 23. PCR de colonias de *Agrobacterium* portadoras del vector *pCP:psy2:crtI*. Carril 2 al 7 se ilustra la amplificación del gen *crtI* optimizado a través de un PCR de colonias de *A.tumefaciens* portadoras del vector *pCP:psy2:crtI*. Carril 8 y 9 se ilustra el control positivo (C+), que corresponde a ADNp y el control negativo (C-), que corresponde a la mezcla de reacción sin templado.

3.3. Análisis de la funcionalidad transcripcional de los vectores *pCP:psy2* y *pCP:psy2:crtI*

Para comprobar la funcionalidad del vector *pCP:psy2* se transformaron transitoriamente frutos de tomate con *A.tumefaciens* portadoras de la construcción de interés, mediante agroinfiltración (sección 2.3.8). Luego de 3-5 días se extrajo ARN de los frutos transformados y se sintetizó ADNc mediante RT-PCR. Se verificó la calidad del ADNc obtenido mediante la amplificación del gen ARN ribosomal *18S*. Todas las muestras de ADNc sintetizadas fueron de buena calidad y no presentaron contaminación con ADN genómico, pues se observó la amplificación de la banda de 196 pb (*18S*) en las muestras de ADNc, la cual no se observó en las muestras con ARN previo al RT-PCR. Luego, se realizó un PCR con los partidores específicos para el gen *psy2* de *D. carota* optimizado (Tabla 3). En las cinco muestras de ARN de tomate agroinfiltradas con el vector *pCP:psy2*, se observó la banda de 606 pb del gen *psy2* optimizado, de igual tamaño que el control positivo (ADNp), la cual está ausente en la muestra agroinfiltrada con el vector sin inserto (Fig. 24).

A)



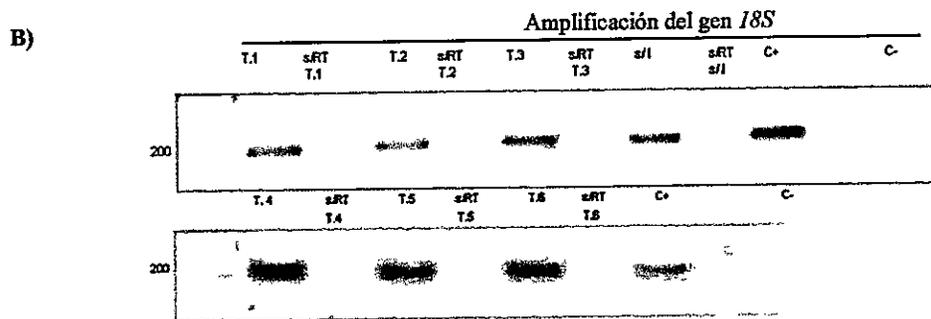


Figura 24. Amplificación del gen *psy2* y *18S* a partir de muestras de ADNc obtenido de frutos de tomate transformados transitoriamente con el vector *PCP:psy2*. A) Amplificación del gen *psy2* optimizado a partir de cADN sintetizado de cinco tomates distintos transformados transitoriamente con el vector *pCP:psy2*. B) Amplificación del gen *18S* a partir de cADN sintetizado de los cinco tomates transformados transitoriamente. Control positivo (C+) corresponde a ADNp, sin inserto (s/I) corresponde a ADNc sintetizado a partir de un tomate transformado transitoriamente con el vector *pCP*, control negativo (C-) corresponde a la mezcla de reacción sin templado, control sin RT (s/RT) corresponde a ARN tratado con DNasa previo al RT-PCR.

Para comprobar la funcionalidad del vector *pCP:psy2:crtI* se transformaron transitoriamente frutos de tomate y de manzana con *A.tumefaciens* transformadas con la construcción de interés, mediante agroinfiltración y se siguió el mismo procedimiento descrito arriba. Todas las muestras de ADNc sintetizadas fueron de buena calidad y no presentaron contaminación con ADN genómico, pues se observó la amplificación de la banda de 196 pb (*18S*) en las muestras de ADNc, lo cual no se observó en las muestras con ARN previo al RT-PCR. En las tres muestras de ARN de tomate y de manzana agroinfiltradas con el vector *pCP:psy2:crtI*, se observó la banda de 131 pb del gen *psy2* optimizado y la banda de 120 pb del gen *crtI*, ambas de igual tamaño que su control positivo respectivo (ANDp). Se puede observar que según lo esperado, las muestras agroinfiltradas con el vector sin inserto (s/I) en el caso del tomate y en el caso de la manzana en la muestra sin transformar no presentan estas bandas (Fig. 25).

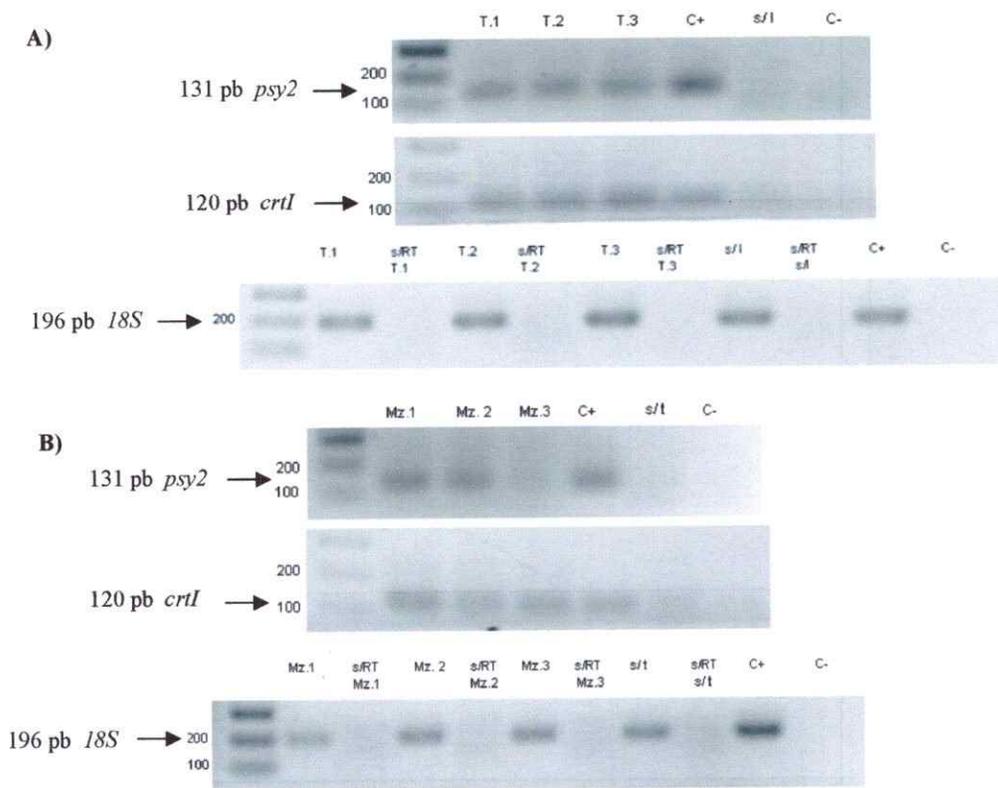


Figura 25. Amplificación del gen *psy2*, *crtI* y *18S* a partir de muestras de ADNc obtenido de frutos de tomate y manzana transformados transitoriamente con el vector PCP:*psy2*:*crtI*. A) Amplificación del gen *psy2*, *crtI* y *18S* a partir de cADN sintetizado de tres tomates distintos transformados transitoriamente con el vector pCP:*psy2*:*crtI*. B) Amplificación del gen *psy2*, *crtI* y *18S* a partir de cADN sintetizado de tres manzanas distintas transformadas transitoriamente con el vector pCP:*psy2*:*crtI*. Control positivo (C+) corresponde a ADNp; sin inserto (s/I) corresponde a ADNc sintetizado a partir de un tomate transformado transitoriamente con el vector pCP; sin transformar (s/t) corresponde a ADNc sintetizado a partir de una manzana silvestre; control negativo (C-) corresponde a la mezcla de reacción sin templado; control sin RT (s/RT) corresponde a ARN tratado con DNasa previo al RT-PCR.

3.4. Determinación de la localización subcelular de las proteínas PSY2 de *D. carota* y PT::CRTI de *X. dendrorhous*

3.4.1. Localización de la proteína PSY2 de *D. carota*

Usando como templado ANDp del vector pUC57:pPG::*psy2*::*nos*, se amplificó el promotor PG seguido del gen *psy2* optimizado sin el codón de término (s/t) (partidores Tabla 3). Se observó la banda esperada de 2.124 pb (Fig. 26).

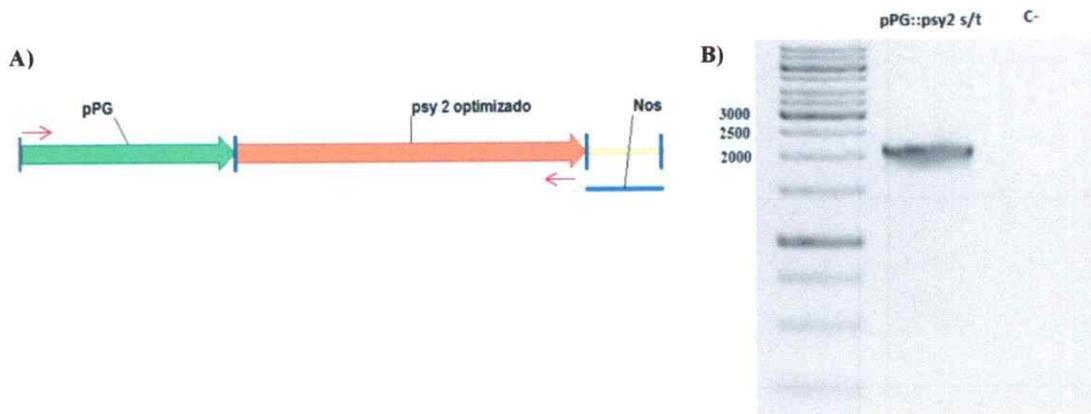


Figura 26. Amplificación del promotor PG seguido del gen *psy2* sin término. A) Esquema que ilustra el sitio de hibridación de los partidores utilizados para amplificar *pPG::psy2 s/t*. B) Gel de electroforesis donde se ilustra la amplificación del *pPG::psy2 s/t*, control negativo (C-) corresponde a la mezcla de reacción sin templado.

Se clonó el producto de PCR en el vector de entrada PCR8[®], se seleccionó con espectinomicina (100 mg/L), verificándose la presencia y orientación del inserto con digestiones enzimáticas con la enzima *BstEII*. En la primera colonia analizada se observaron las bandas correspondientes al inserto clonado en sentido (3.894 y 1.047 pb), por lo que ésta fue seleccionada para la recombinación (Fig. 27).

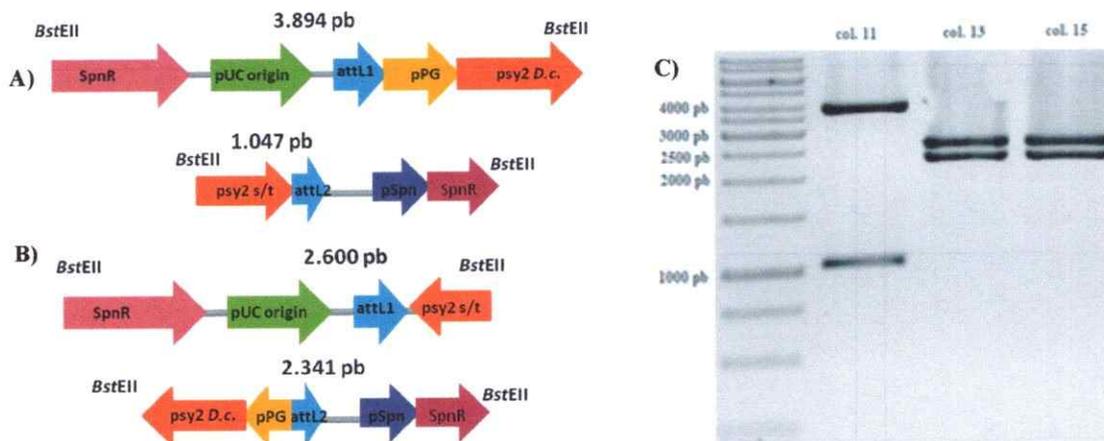


Figura 27. Digestión con *BstEII* del vector PCR8:*pPG::psy2 s/t*. A) Mapa de restricción del vector PCR8 con el inserto *pPG::psy2 s/t* clonado en sentido. B) Mapa de restricción del vector PCR8 con el inserto clonado en antisentido. C) Gel de electroforesis donde se ilustra el ADNp de tres colonias de *E.coli* transformadas con el vector de interés digeridas con *BstEII*.

A continuación se recombinó el vector PCR8:*pPG::psy2* s/t con el vector de destinación pMDC107, para realizar una fusión C-terminal a GFP, mediante LR clonasa. Se seleccionó con kanamicina (100 mg/L), verificándose la presencia y la correcta orientación del inserto mediante digestiones enzimáticas con las enzimas *Nco*I y *Hind*III. En todas las colonias analizadas se observaron las dos bandas de 10.709 pb y 1.531 pb esperadas, para una recombinación del inserto *pPG::psy2* s/t en sentido al gen *gfp* del vector pMDC107 (Fig. 28).

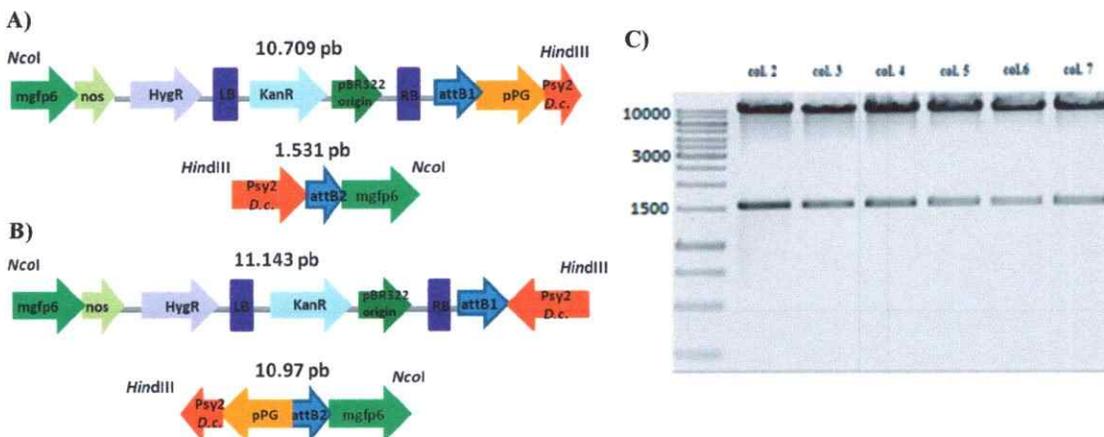


Figura 28. Digestión con *Nco*I-*Hind*III del vector pMDC107:*pPG::psy2::gfp*. A) Mapa de restricción del vector pMDC107 con el inserto *pPG::psy2* s/t en sentido al gen *gfp*. B) Mapa de restricción del vector pMDC107 con el inserto *pPG::psy2* s/t en antisentido al gen *gfp*. C) Gel de electroforesis de ANDp de seis colonias de *E.coli* transformadas con el vector de interés digeridas con *Nco*I-*Hind*III.

Finalmente, el vector de destinación pMDC107:*pPG::psy2::gfp* fue transformado en *A. tumefaciens* por golpe de frío, se seleccionó kanamicina (100 mg/L), más gentamicina (50 mg/L) y rifampicina (10 mg/L). Se corroboró la presencia del vector mediante PCR de colonias usando partidores específicos para el gen *psy2* de *D. carota* fusionado al gen *gfp* (Tabla 3). En seis colonias analizadas se observó la banda esperada de 1.824 pb (Fig. 29).

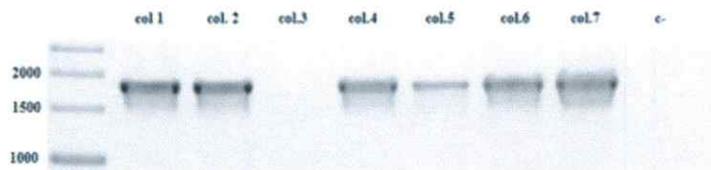
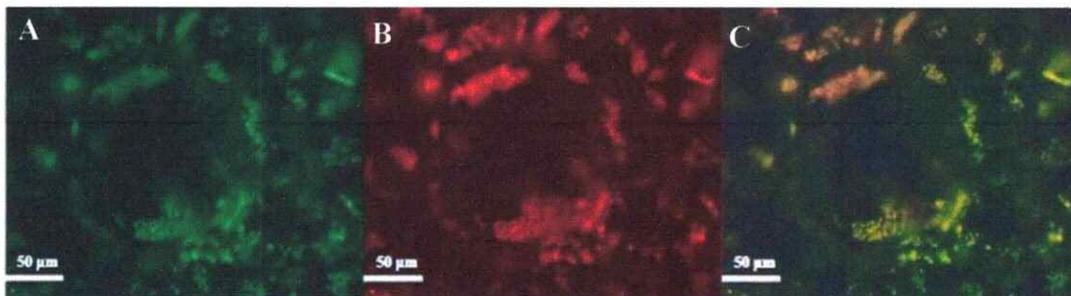


Figura 29. PCR de colonias de *Agrobacterium* portadoras del vector pMDC107:pPG::psy2::gfp. Amplificación del gen *psy2* fusionado al gen *gfp* a través de un PCR de colonias de *A.tumefaciens* portadoras del vector pMDC107:pPG::psy2::gfp. El control negativo (C-) corresponde a la mezcla de reacción sin templado.

Se transformaron transitoriamente frutos de tomate con *A. tumefaciens* portadoras del vector pMDC107:pPG::psy2::gfp mediante agroinfiltración. Luego de 4 días se cortaron unas capas celulares muy finas (200-300 μm) y se observaron por microscopía de epifluorescencia. Como se puede observar en la figura 30A, el patrón de fluorescencia de GFP se localiza principalmente en los plastidios, lo que se puede comprobar al hacer la sobreposición de esta imagen con la fluorescencia propia de la clorofila (30B), observándose una co-localización en amarillo (30C). Fluorescencia de tal intensidad no se observó en cortes de frutos de tomates transformados con el vector sin inserto (Fig. 30E). Esto sugiere que el patrón de fluorescencia observado en A es el de la proteína de fusión PSY2::GFP, la cual se estaría destinando correctamente a los plastidios.



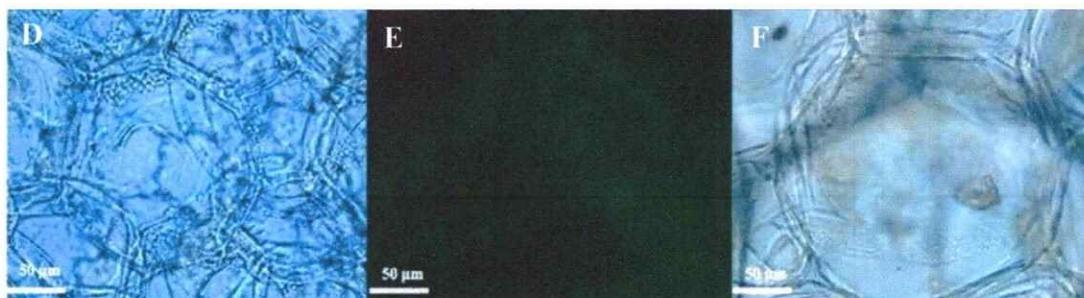


Figura 30. Microscopía de epifluorescencia de frutos de tomate transformados transitoriamente con el vector pMDC107:pPG::psy2::gfp. A) Fluorescencia de GFP de transformaciones con pMDC107:pPG::psy2::gfp, excitación 465-495 nm (filtro U-N31001). B) Fluorescencia de clorofilas de A, excitación 515-555 nm (filtro U-MNG2). C) Sobreposición de A y B, el color amarillo indica co-localización. D) Campo claro de A-B. E) Control negativo: auto-fluorescencia verde de transformaciones con pMDC107 sin inserto. F) Campo claro de E. Amplificación 20X. n=3.

De forma adicional se realizó un análisis *in silico* usando programas computacionales disponibles en la web para determinar la localización subcelular de la proteína PSY2 de *D.carota* en plantas. Como se observa en la Tabla 5, en todos los programas utilizados se obtuvieron elevadas probabilidades de una localización cloroplástica, lo cual se complementa y correlaciona con los resultados obtenidos mediante microscopía.

Tabla 5. Análisis bioinformático de la localización subcelular de la proteína PSY2.

Software on-line	Descripción	Resultados	Detalles
WoLF-PSORT	Localización subcelular de proteínas eucariontes (plantas, animales, hongos)	Cloroplasto	CL: 6.0, CM: 3.0, N: 2.0, MP: 1.0, CT: 1.0
Y-loc	Localización subcelular de proteínas eucariontes (plantas, animales, hongos)	Cloroplasto	99.6% de probabilidad
SubcellProt	Localización subcelular de proteínas de plantas	Cloroplasto	85% de probabilidad
EpiLoc	Localización subcelular de proteínas eucariontes (plantas, animales, hongos)	Cloroplasto	CL: 0.853; VC: 0.072; CM: 0.022; M: 0.019; GA: 0.011; PX: 0.009; ER: 0.006; EC: 0.004; N: 0.003; MP:0.001
Plant-mPloc	Localización subcelular de proteínas de plantas	Cloroplasto	-
BaceILO	Localización subcelular de proteínas eucariontes (plantas, animales, hongos)	Cloroplasto	-

Leyenda: CL: cloroplasto; CM: citoplasma; CT: citoesqueleto; ER: Retículo endoplásmico; EC: extracelular; GA: Aparato de Golgi; M: Mitocondria; MP: membrana plasmática; N: núcleo; PX: peroxisoma; VC: vacuola.

3.4.2. Localización de la proteína PT::CRTI.

Usando como templado ADNp del vector pUC57:pPG::pt::crtI::nos se amplificó el promotor PG seguido del péptido de tránsito a cloroplasto fusionado al gen *crtI* sin el codón de término (s/t) (partidores Tabla 3). Se observó la banda esperada de 2.719 pb (Fig. 31).

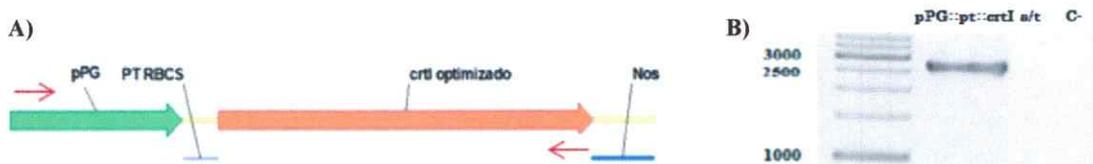


Figura 31. Amplificación del promotor PG seguido del *pt* fusionado al gen *crtI* sin término. A) Esquema que ilustra el sitio de hibridación de los partidores utilizados para amplificar *pPG::pt::crtI* s/t. B) Gel de electroforesis donde se ilustra la amplificación del *pPG::pt::crtI* s/t, control negativo (C-) corresponde a la mezcla de reacción sin templado.

Se clonó el producto de PCR en el vector de entrada PCR8[®], se seleccionó con espectinomicina, verificándose la presencia y orientación del inserto con digestiones enzimáticas utilizando las enzimas *PstI*-*XbaI*. En la primera colonia analizada se observaron las bandas correspondientes al inserto clonado en sentido (4.542 y 994 pb), por lo que ésta fue seleccionada para la recombinación (Fig. 32).

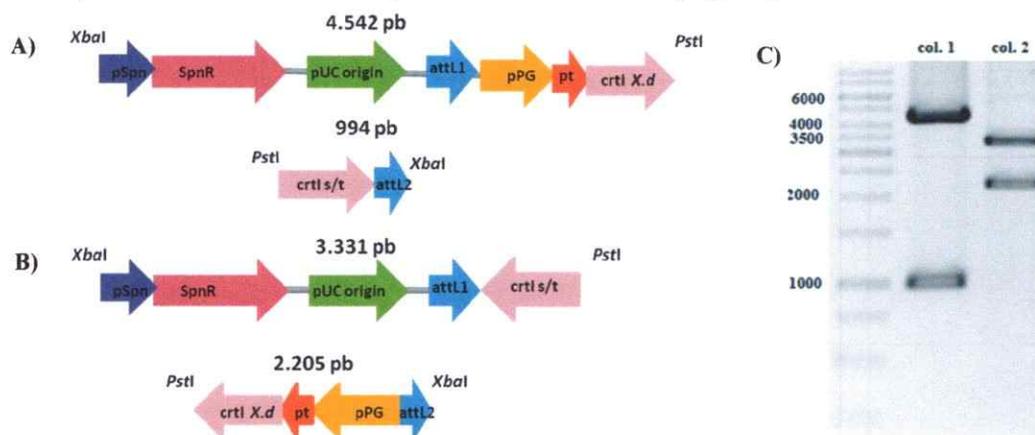


Figura 32. Digestión con *PstI*-*XbaI* del vector PCR8:pPG::pt::crtI s/t. A) Mapa de restricción del vector PCR8 con el inserto *pPG::pt::crtI* s/t clonado en sentido. B) Mapa de restricción del vector PCR8 con el inserto clonado en antisentido. C) Gel de electroforesis donde se ilustra el ADNp de dos colonias de *E.coli* transformadas con el vector de interés digeridas con *PstI*-*XbaI*.

A continuación se recombinó el vector PCR8:*pPG::pt::crtI* s/t con el vector de destinación pMDC107 mediante LR clonasa, se seleccionó con kanamicina (100 mg/L), verificándose la presencia y la correcta orientación del inserto mediante digestiones enzimáticas con las enzimas *NcoI* y *EcoRV*. En todas las colonias analizadas se observaron las bandas de 6.318-2.624-2.157-1.736 pb esperadas, para una recombinación del inserto *pPG::pt::crtI* s/t en sentido al gen *gfp* del vector pMDC107 (Fig. 33).

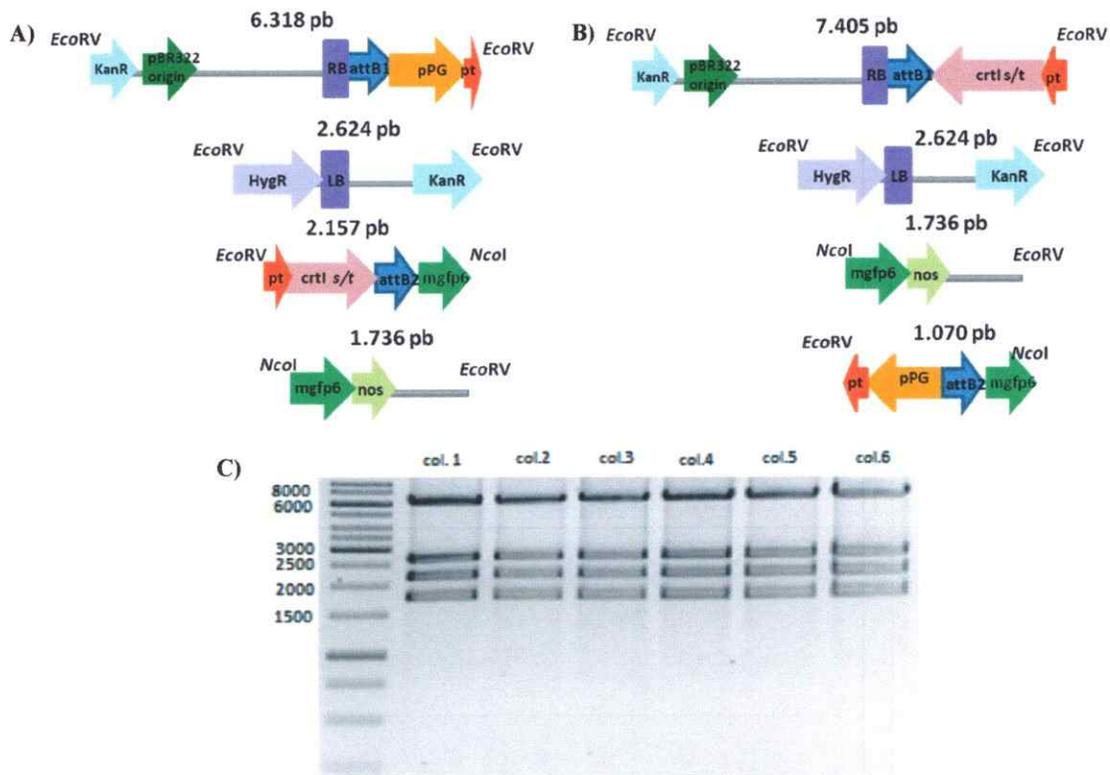


Figura 33. Digestión con *NcoI*-*EcoRV* del vector pMDC107:*pPG::pt::crtI::gfp*. A) Mapa de restricción del vector pMDC107 con el inserto *pPG::pt::crtI* s/t en sentido al gen *gfp*. B) Mapa de restricción del vector pMDC107 con el inserto en antisentido al gen *gfp*. C) Gel de electroforesis de ANDp de seis colonias de *E.coli* transformadas con el vector de interés digeridas con *NcoI*-*EcoRV*.

Finalmente, el vector de destinación pMDC107:*pPG::pt::crtI::gfp* fue transformado en *A. tumefaciens* por golpe de frío, se seleccionó con kanamicina (100 mg/L), más

gentamicina (50 mg/L) y rifampicina (10 mg/L). Se corroboró la presencia del vector mediante PCR de colonias usando partidores específicos para el gen *crtI* de *X. dendrorhous* fusionado al gen *gfp* (Tabla 3). En dos colonias analizadas se observó la banda esperada de 2.609 pb (Fig.34).

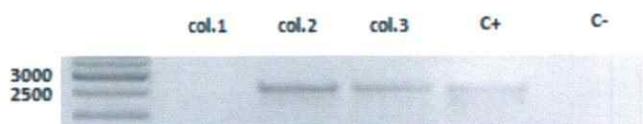


Figura 34. PCR de colonias de *Agrobacterium* portadoras del vector pMDC107:pPG::pt::crtI::gfp. Carril 2 al 7 se ilustra la amplificación del gen *crtI* fusionado al gen *gfp* a través de un PCR de colonias de *A.tumefaciens* portadoras del vector pMDC107:pPG::pt::crtI::gfp. El control negativo (C-) corresponde a la mezcla de reacción sin templado.

Al igual que con la proteína PSY2::GFP, se transformaron transitoriamente frutos de tomate con *A. tumefaciens* portadoras del vector pMDC107:pPG::pt::crtI::gfp. Luego de 4 días se cortaron unas capas celulares muy finas y se observaron por microscopía de epifluorescencia. Como se observa en la figura 35B, el patrón de fluorescencia de GFP se localiza principalmente en los plastidios, esto se comprueba sobreponiendo esta imagen con la de fluorescencia de la clorofila (35A), donde se observa una co-localización en color amarillo (35C). Fluorescencia de tal intensidad no se observa en cortes de frutos de tomates transformados con el vector sin inserto (35F); pese a que en este corte se observan claramente los plastidios al excitar a la clorofila (35E). Esto sugiere que el patrón de fluorescencia observado en B es el de la proteína de fusión PT::CRTI::GFP, la cual se estaría destinando correctamente a los plastidios. Como control negativo adicional, se transformaron frutos de tomates con el vector pCAMBIA1302:pPG::gfp, donde se observó un patrón de fluorescencia citoplasmático de GFP (35H).

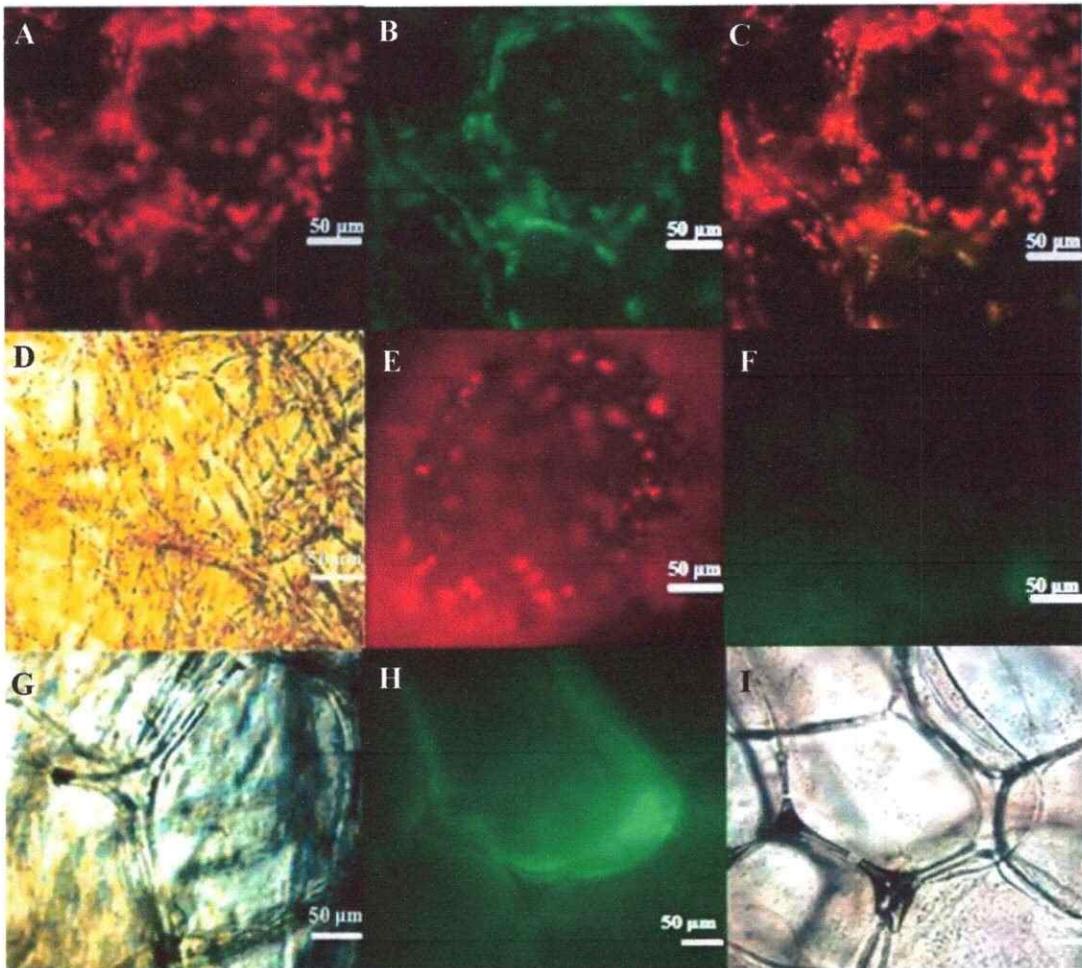


Figura 35. Microscopía de epifluorescencia de frutos de tomate transformados transitoriamente con el vector pMDC107:pt::crtI::gfp. A) Fluorescencia de la clorofila de transformaciones con pMDC107:pPG::pt::crtI::gfp, excitación 515-555 nm (filtro U-MNG2). B) Fluorescencia de GFP de transformaciones con pMDC107:pPG::pt::crtI::gfp, excitación 465-495 nm (filtro U-N31001). C) Sobreposición de A y B, el color amarillo indica co-localización. D) Campo claro de A-B. E) Fluorescencia de la clorofila de transformaciones con pMDC107 sin inserto excitado con 515-555 nm. F) Control negativo: auto-fluorescencia verde, transformaciones con pMDC107 sin inserto excitado con 465-495 nm. G) Campo claro E-F. H) Fluorescencia de GFP de transformaciones con pCambia1302:pPG::gfp excitado con 465-495 nm. I) Campo Claro de H. Amplificación 20X. n=2.

En este caso también se realizaron análisis *in silico* con los programas de predicción de localización subcelular de proteínas previamente mencionados. Como se observa en la Tabla 6, en cinco de los seis programas utilizados se obtuvo una localización

únicamente cloroplástica, lo que refuerza los resultados obtenidos a través de microscopía.

Tabla 6. Análisis bioinformático de la localización subcelular de la proteína PT::CRTI.

Software on-line	Descripción	Resultados	Detalles
WoLF-PSORT	Localización subcelular de proteínas eucariontes (plantas, animales, hongos)	Cloroplasto	CL: 10.0, CM: 1.0, MP: 1.0, M: 1.0
Y-loc	Localización subcelular de proteínas eucariontes (plantas, animales, hongos)	Cloroplasto	98.05% de probabilidad
SubcellProt	Localización subcelular de proteínas de plantas	Cloroplasto	85% de probabilidad
EpiLoc	Localización subcelular de proteínas eucariontes (plantas, animales, hongos)	Citoplasma-Cloroplasto	CM: 0.267; CL: 0.232; M: 0.160; VC: 0.151; PX: 0.114; ER: 0.034; N: 0.014; EC: 0.012; GA: 0.011; MP:0.005
Plant-mPloc	Localización subcelular de proteínas de plantas	Cloroplasto	-
BaceILO	Localización subcelular de proteínas eucariontes (plantas, animales, hongos)	Cloroplasto	-

Leyenda: CL: cloroplasto; CM: citoplasma; CT: citoesqueleto; ER: Reticulo endoplásmico; EC: extracelular; GA: Aparato de Golgi; M: Mitocondria; MP: membrana plasmática; N: núcleo; PX: peroxisoma; VC: vacuola

4. DISCUSIÓN

Obtención del Vector pCP con libertad de operar.

Al diseñar un proyecto aplicado que utilizará ingeniería metabólica como éste, se debe tener precaución con los derechos de propiedad intelectual bajo los cuales se encuentran algunos de los fragmentos genéticos a utilizar. Debido a esto, se decidió construir un nuevo vector de destinación "freedom to operate", el que contará con tres sitios de restricción específicos en el sitio múltiple de clonamiento. Es importante mencionar que los sitios de restricción factibles a utilizar eran bastantes limitados pues no debían cortar el promotor PG, el terminados Nos, el péptido de tránsito ni los tres genes carotenogénicos que se van a utilizar en el vector triple (*psy2*, *crtI* y *lcyβ1*). También debimos tener cuidado de no utilizar un vector que confiriera resistencia a algún antibiótico en plantas.

Se decidió utilizar el marcador de selección *bar*, el cual confiere resistencia al herbicida bialaphos en plantas. Este herbicida contiene dos residuos de L-alanina y un residuo de fosfotricina (PPT), análogo del glutamato. En plantas, peptidasas intracelulares rompen el tripéptido liberando el PPT activo, el cual es un inhibidor de la enzima glutamina sintasa, lo que lleva a la acumulación de amonio y la inhibición de la fotosíntesis. El gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* codifica para una enzima que acetila el PPT, el que otorga completa tolerancia al herbicida (Thompson y col, 1987). Se consideró que tener un mecanismo de selección que pudiera ser rociado, como un herbicida, sería favorable a la hora de seleccionar un elevado número de plántulas de

manzano. Por otro lado, las plantas transgénicas tolerantes al herbicida fosfinotricina ya se encuentran en el mercado hace más de 10 años (<http://archive.greenpeace.org>).

Encontrar todas estas cualidades en un vector comercial con libertad de operación fue imposible, por lo que se eligió modificar el vector pB7FGW2, el cual es un vector Gateway® y como tal el esqueleto del que se constituye está derivado del vector pPZP200; el cual contiene un origen de replicación en *E.coli* y *Agrobacterium* (ColE1 y pVS1), un sitio pBR322bom que permite la movilización desde *E.coli* a *Agrobacterium*, los bordes del T-ADN derivados del plásmido pTiT37 y la resistencia a Espectinomicina para la selección en bacterias (Hajdukiewicz y col, 1994). El vector pB7FGW2 posee además el gen *bar* que confiere resistencia a fosfinotricina en plantas (Karimi y col, 2002). Debido a que eliminamos por digestiones enzimáticas los sitios de recombinación Gateway (*att*) los cuales están sometidos a protección intelectual y a que nos quedamos básicamente con el esqueleto del vector pPZP200 más el marcador de selección en plantas (*bar*), los cuales debido a su antigüedad estarían libres de patentes al momento de la transformación de las manzanas, se estará trabajando con un vector binario libre de operar.

Al esqueleto del vector binario le ligamos un Sitio de Múltiple Clonamiento diseñado por nosotros. Es importante mencionar, que clonar fragmentos pequeños como era el SMC, en un vector binario de aproximadamente 8.000 pb, puede tener algunos inconvenientes ya que los fragmentos pequeños digeridos se ligan entre sí. Esto no sucedió en este trabajo, como se puede comprobar por el PCR realizado (Fig. 7), donde se observó una única banda cercana a 141 pb, pese al extenso de tiempo extensión que se dio (30 seg.).

Se deberán analizar los derechos de propiedad intelectual del péptido de tránsito y del terminador *nos* al momento que se comience a transformar las plantas. La secuencia del promotor PG fue obtenida en el laboratorio a partir de una variedad chilena, por lo que estaría libre de derechos. Por otro lado, los genes carotenogénicos a utilizar están libres de protección intelectual, sin mencionar que optimizamos su secuencia nucleotídica por lo que su secuencia difiere en gran parte a la presente en la base de datos.

Optimización de los codones, síntesis y obtención de las construcciones pCP:*psy2*, pCP:*psy2:crtl*.

El objetivo de este proyecto fue generar vectores que permitan elevar el contenido de los carotenoides en los frutos, pero los niveles de una proteína en una célula eucarionte dependen de una serie de factores que regulan desde la expresión génica hasta la traducción de la misma. Entre ellos tenemos el control de la transcripción (promotor, elementos regulatorios: activadores o represores); el procesamiento del ARN; el transporte y localización del ARNm; la traducción y finalmente la degradación del ARNm.

Dentro del control de la traducción la adaptación del uso de codones del gen transcrito al uso de codones del hospedero es un factor importante (Lithwick & Margalit, 2003). La degeneración del código génico permite que múltiples secuencias de ácidos nucleicos codifiquen la misma proteína. La frecuencia con la cual diferentes codones son usados varía ampliamente entre diferentes organismos e incluso entre proteínas expresadas a altos o bajos niveles dentro del mismo (Gouy & Gautier, 1982). Los genes

altamente expresados en los genomas procariontes usan un pequeño subgrupo de codones que son reconocidos por los ARNt más abundantes (Ikemura, 1981). Si un gen contiene codones que no son comunes para el hospedero o viene de un organismo que usa un código genético no canónico, sus niveles de expresión no serán máximos, por eso la optimización del uso de codones para la expresión heteróloga de una proteína es uno de los primeros pasos (Gustafsson y col, 2004).

Un ejemplo del cambio dramático que genera la optimización de los codones es la expresión del gen original de control de insectos de *Bacillus thuringiensis* (*cryIA*) con respecto del optimizado (21% de diferencia nucleotídica), en tomate y tabaco. La modificación genera un aumento drástico en los niveles de proteína en las plantas transgénicas (100 veces en comparación a la original), lo que causa un gran aumento en la resistencia a los insectos en estas plantas (Perlak y col, 1991).

Durante la optimización, la secuencia de interés es cambiada de acuerdo al uso preferencial de codones del organismo hospedero, lo ideal es utilizar una tabla que contenga el promedio del uso de codones de genes ribosomales o de un grupo de genes altamente expresados (Puigbo y col, 2007). En este caso se contaba con la tabla del uso de codones de 567 ARNm del genoma de *Malus domestica*; la cual se consideró una población suficiente (163.086 codones) para guiar en la preferencia del uso de codones, o por lo menos para discriminar los codones inusuales (<http://www.kazusa.or.jp>).

Se realizó un análisis del uso del contenido de GC en los CDS de manzana, donde se obtuvo un contenido de GC promedio a 47,98%, un poco superior al contenido de GC promedio en los CDS de la zanahoria 45,6%; por lo que se decidió optimizar la secuencia. Por otro lado el contenido de GC de *X. dendrorhous* es de 51.54%, superior al

de manzana, por lo que se optó por optimizar el gen *crtI*, principalmente por provenir de un reino distinto.

Existen diferentes métodos para la optimización de los codones, en este trabajo se eligió “un aminoácido-un codón” donde todos los codones que codifican para el mismo aminoácido son substituidos por aquél usado preferentemente en el organismo de referencia. Si bien este método puede generar ciertos desbalances en la traducción debido a una alteración de la población de ARNt, creemos que al usar un promotor fruto-específico en vez de uno constitutivo evitaríamos producir este tipo de inconveniente.

En la optimización del gen *psy2* de *D.carota* muchos codones se conservaron, pues los usados preferentemente en zanahoria eran los mismos que en manzana, sin embargo existen casos como (Tyr-Thr-Ser-Gln-Asn-Ile-Phe-Glu) donde se invirtió completamente la preferencia de los codones utilizados (Fig. 10B).

En la optimización del uso de codones del gen *crtI* de *X. dendrorhous* también se conservaron bastantes codones, pero de igual forma que con el gen *psy2* una serie de codones que codifican para ciertos aminoácidos (Tyr-Ile-Pro-Arg-Ser-Thr) sufrieron un cambio total (Fig. 10D). Es interesante destacar que la mayoría de los aminoácidos que sufrieron la optimización, se conservan en el gen *psy2* y el gen *crtI*, pese a que provienen de reinos distintos, lo cual demuestra la divergencia evolutiva entre la manzana (Rosacea) y la zanahoria (Apiaceae).

La funcionalidad *in silico* de estas construcciones optimizadas se analizó mediante el programa FGGENESH que reconoce promotores y genes de plantas. Se eligió este programa ya que es el más rápido y el más exacto buscador de genes disponible. En

el proyecto de secuenciación del genoma del arroz fue descrito como el programa más exitoso (de 5 analizados) y fue usado para predecir el 87% de todos los genes (Yu y col, 2002). Este programa predijo sólo un gen para ambas construcciones cuya secuencia nucleotídica coincide a la perfección con el gen *psy2* y *pt::crtI* optimizados (Fig.11), lo que nos permitió comprobar el correcto ensamblaje del promotor, el péptido de tránsito, los genes y el terminador de la transcripción.

Posteriormente, las secuencias diseñadas fueron enviadas a sintetizar a la empresa GenScript. La síntesis de estas construcciones nos permitió ahorrar bastante tiempo experimental, y la secuenciación de las mismas nos permitió verificar la perfecta concordancia con las secuencias bioinformáticas originales.

Las construcciones en el vector pUC57 eran prácticamente del mismo tamaño que el propio vector, lo cual nos generó un inconveniente experimental. Debido a esto, luego de realizar las digestiones se debieron separar las bandas que correspondían a las construcciones en geles de agarosa largos, los cuales debieron ser corridos por 1:30 hrs. o más tiempo (Fig. 14 y 20). Otra alternativa habría sido digerir el vector pUC57 con la enzima que liberaba las construcciones junto con una enzima que cortara el vector pero no las construcciones, sin embargo no contábamos con enzimas de estas características. Pese a estos inconvenientes se lograron purificar ambas construcciones y generar los vectores *pCP:psy2* y *PCP:psy2:crtI*.

Elección de los genes carotenogénicos y del promotor que aumentarán el contenido de los carotenoides en los frutos.

Se decidió generar un vector sólo con el gen *psy* y otro con los dos genes en tándem, ya que como se mencionó en la introducción existen especies vegetales que sólo requieren la amplificación de la enzima PSY, la cual cataliza el paso limitante de la ruta, para elevar el contenido de los carotenoides (Ej: canola) (Shewmaker y col, 1999); mientras que otras especies necesitan la sobre-expresión del gen *psy* en conjunto con el gen de la fitoeno desaturasa, enzima que cataliza el paso río abajo en la ruta, para elevar el contenido de estos metabolitos (Ej: arroz) (Beyer y col, 2002). Los genes que necesitará la manzana para elevar el contenido de carotenoides en su pulpa son impredecibles, pues cada organismo se comporta de forma distinta.

Es deseable que el organismo a modificar genéticamente posea genes endógenos de la ruta de síntesis de los carotenoides y un perfil basal conocido de ellos (Fraser & Bramley, 2004). Estudios realizados en el laboratorio demuestran que la manzana posee los tres genes esenciales para la síntesis de β -caroteno (*psy-pds-lcy β*), los cuales son transcritos en la pulpa, varían su expresión durante la maduración de la fruta y generan un perfil basal de carotenoides en ella (Cerdeira y col, 2012). Esto podría disminuir el número de genes necesarios a introducir en la manzana, pues se ha visto que la expresión heteróloga de los genes carotenogénicos claves en la ruta como *lcy β* de *D. carota* generan un aumento en la expresión de los genes endógenos (*psy* y *pds*) en tabaco, esta regulación positiva de la ruta causa un gran incremento en los niveles de los carotenoides (Moreno, 2012; Rosas, 2012).

En *A. thaliana* se ha visto que la enzima PSY es responsable de la regulación de la ruta de biosíntesis de los carotenoides, al generar un “feed-back” positivo sobre la enzima DXS (1-desoxi-d-xilulosa-5-fosfato-sintasa), la cual genera los precursores necesarios de la ruta de síntesis (Rodríguez y col, 2009). Este “feed-back” positivo podría explicar por qué la activación de los genes endógenos como *psy*, causaría tal incremento en los niveles de carotenoides.

Otro ejemplo de un aumento en los carotenoides debido a la regulación de la ruta endógena fue la introducción del gen *crtI* de *E. uredovora* en tomate bajo el control del promotor 35S, lo que resultó en un incremento de tres veces en los niveles de β -caroteno, hasta 45% de los carotenoides totales. Este resultado era inesperado pues el producto final de la actividad de la enzima CRTI es el licopeno, análisis de expresión mostraron que los genes endógenos *pds*, *zds* y *lcy β* estaban aumentados, lo que convertiría el licopeno en β -caroteno (Romer y col, 2000).

Al manipular una ruta metabólica compleja como ésta es necesario tener en cuenta que la síntesis de β -caroteno es inducida por GGPP, un precursor esencial en otras rutas metabólicas que llevan a la síntesis de Vitamina E (α -tocoferol), ácido giberélico y clorofilas, por lo que el re-direccionamiento de este precursor hacia la síntesis de carotenoides puede disminuir estos otros compuestos, generándose efectos fenotípicos no deseados (Fray y col, 1995; Sandmann, 2001). Esto puede ser evitado direccionando las enzimas hacia tejidos cuyo metabolismo primario sea bajo, como frutas y semillas, mediante promotores tejido-específico (Naik y col, 2003).

La elección del promotor es muy importante, pues sus propiedades controlarán la dinámica, los niveles de expresión y la especificidad de tejido del gen de interés. En este trabajo se eligió utilizar un fragmento de 806 pb del promotor específico de fruto maduro del gen de la poligalacturonasa (PG) de tomate, el cual es capaz de dirigir la expresión de GUS en todo el pericarpo del fruto maduro (Montgomery y col, 1993).

Ya que la expresión del gen de la poligalacturonasa se incrementa durante la maduración del fruto, existe una correlación cruda entre los niveles de la actividad enzimática de la PG y el grado de blandura de los mismos (DellaPenna y col, 1986; Ahrens & Huber, 1990). Sin embargo, experimentos diseñados directamente para dilucidar el papel de la poligalacturonasa en la maduración, indican que la actividad de la enzima por sí sola, no es suficiente para lograr este grado de suavidad (Giovannoni y col, 1989). Esta característica se debería a la acción concertada de varias enzimas hidrolíticas de la pared celular presentes en el fruto maduro, dentro de las cuales se encuentra la poligalacturonasa (Schuch y col, 1991).

Otra característica importante de este promotor es que no depende de etileno, hormona vegetal importante en la maduración de los frutos climatéricos como el tomate. La exposición de frutos inmaduros al etileno exógeno induce la expresión de genes de maduración de respuesta a etileno, pero no induce la expresión de PG (Lincoln y col, 1987). Esto es importante pues la manzana es un fruto no climatérico y su maduración no depende de la acumulación de etileno (<http://www.postharvest.com>).

Estos antecedentes nos permitieron proponer que el promotor de la PG funcionaría de forma fruto maduro específica en manzana. La principal diferencia en la anatomía del tomate, un berry de pericarpo carnoso y la manzana, es que esta última es

un pomo, un fruto accesorio donde el ovario central portador de la semilla está rodeado de un grueso hypanthium carnosos, el cual no es parte del pericarpo sino que se deriva de la fusión de los pétalos y los sépalos (<http://waynesword.palomar.edu>).

Pese a las diferencias en la anatomía y en la dependencia de etileno para la maduración de los frutos, al igual que en el tomate, el gen de la poligalacturonasa aumenta su expresión durante la maduración de la manzana (Janssen y col, 2008). Se ha caracterizado su promotor y se demostró que un fragmento de 1460 y 532 pb eran suficientes para dirigir la expresión de GUS en forma fruto maduro específica en los tomates transgénicos (Atkinson y col, 1998). Estos antecedentes respaldan el uso del promotor PG de tomate para la expresión fruto específica de genes carotenogénicos.

Evaluación de la funcionalidad de los vectores pCP:*psy2* y pCP:*psy2:crtI*.

Los resultados experimentales demostraron que ambos vectores construidos son transcripcionalmente activos en frutos de tomate, ya que mediante RT-PCR de los frutos transformados transitoriamente con los vectores, se detectó únicamente el transcrito del gen *psy2* (pCP:*psy2*) o en conjunto con el del gen *crtI* (pCP:*psy2:crtI*) (Fig.24 y 25A). También se demostró que el promotor PG es activo en manzana, pues utilizando el vector doble (*psy2-crtI*) se transformaron transitoriamente frutos de manzano y se logró detectar el transcrito de ambos genes en la pulpa de la fruta (Fig. 25B y 26). En la muestra número tres de manzana se detectó únicamente la presencia del transcrito del gen *crtI*, no así la del gen *psy2*, pese a que se usó el vector doble. Esto pudo deberse a que la muestra de ARNm se debe haber degradado en el extremo 5' o la síntesis del ADNc no fue completa, lo que impidió el alineamiento de los partidores del gen *psy2* de

D. carota, los cuales hibridan en el extremo 5' de la secuencia codificante, mientras que los partidores del gen *crtI* de *X. dendrorhous* hibridan más cerca del extremo 3'. Sin embargo, en las otras dos muestras se logró exitosamente amplificar ambos genes luego de la Agroinfiltración, lo cual indica la funcionalidad transcripcional de los genes y la correcta construcción del vector generado. Es importante mencionar que al utilizar el vector doble, se demuestra indirectamente la funcionalidad transcripcional del vector *pCP:psy2* en manzana, pues el primero se deriva de él.

Otro punto a destacar es que el organismo a modificar genéticamente debe tener estructuras especializadas capaces de incorporar moléculas altamente lipofílicas como los carotenoides, los cuales se pueden acumular en todos los tipos de plastidios, excepto en los proplastidios, esto incluye los cromoplastos (frutos y flores), amiloplastos (plastidios ricos en almidón), elaioplastos (plastidios acumuladores de lípidos), leucoplastos (plastidios incoloros) y etioplastos (precursores en oscuridad de los cloroplastos) (Naik y col, 2003; Howitt & Pogson, 2006).

La mayoría de las manzanas comerciales poseen una pulpa blanca con contenido de carotenoides muy bajo (<2.5 µg/g FW), durante la madurez los carotenoides y la clorofila están restringidos a la células de la piel. En un estudio realizado en distintas variedades genotípicas de manzanas, las cuales poseían colores de pulpa desde blanco a amarillo, pudieron relacionar el cambio de color con un cambio en los niveles de carotenoides y la expresión de varios genes carotenogénicos. También encontraron que en las distintas variedades de manzanas de pulpa blanca existían plastidios capaces de acumular carotenoides, por lo que la ausencia de los pigmentos en la pulpa se debería a una regulación genética. Las enzimas Z-ISO y CRTISO se describieron como limitantes

en la carotenogénesis de la manzana (Ampomah-Dwamena y col, 2012). Este antecedente refuerza la idea de modificar la manzana genéticamente con la enzima CRTI de *X. dendrorhous*, la cual cumple con todas las actividades enzimáticas que generan licopeno (Fig. 1).

En este mismo tópico los frutos de manzano acumulan elevadas cantidades de almidón. La degradación de éste a azúcares más simples es un proceso característico de la maduración, por lo que se utiliza comúnmente un test de yodo para medir la maduración de los frutos y el periodo adecuado de cosecha (Cho & Gil, 2004). La concentración de almidón alcanza 120 mg/g FW cuando los frutos poseen 50 mm de diámetro, luego se mantiene constante y durante las dos últimas semanas de maduración comienza su degradación (<http://www.actahort.org>).

Los gránulos de almidón se acumulan en plastidios especializados llamados amiloplastos, los cuales se observaron llenos de gránulos de almidón en el proceso de rápido crecimiento de los frutos de manzano (Fuji) (Kirk & Tiliney-Bassett, 1978; Peng & Zhang, 2000). Se ha visto que los carotenoides se acumulan en niveles substanciales en los amiloplastos de maíz y que incluso están presentes en los amiloplastos casi blancos del trigo (Hentschel y col, 2002; Panfili y col, 2004). Esto sugiere, que los amiloplastos presentes en la pulpa de la manzana son capaces de acumular los carotenoides que se generarán luego de la manipulación genética.

Evaluación de la localización subcelular de las proteínas PSY2 y PT::CRTI

Debido a la importancia de la correcta localización plastidial de los carotenoides y las enzimas carotenogénicas, se decidió determinar la localización subcelular de la

proteína PSY2 de *D. carota* optimizada y de la proteína CRTI de *X. dendrorhous* optimizada fusionada al péptido de tránsito. Para cumplir este objetivo, se combinaron técnicas moleculares y bioinformáticas.

Mediante técnicas de biología molecular se amplificó el promotor PG seguido de la secuencia codificante del gen *psy2* de *D. carota* optimizado, o del péptido de tránsito fusionado a la secuencia codificante del gen *crtI* de *X. dendrorhous* optimizado. Se utilizó Elongasa® para la amplificación debido a que es adecuada para amplificar templados largos y por la actividad correcta (“proof reading”) 3’a 5’ exonucleasa. Se decidió amplificar el promotor seguido de los genes, ya que esto nos permitirá comprobar la funcionalidad de las construcciones sintetizadas, en adición a la correcta localización de las proteínas. Se logró amplificar y clonar en sentido en PCR8® ambos fragmentos, los que luego fueron recombinados en el vector pMDC107, donde el fragmento de interés quedó con una fusión GFP C-terminal.

Para visualizar la fluorescencia de GFP se utilizó un microscopio de epifluorescencia con un filtro U-N31001 para el haz azul, como se observa en la figura 36, éste posee un filtro de excitación (BP) pasa banda de 465-495 nm, esto quiere decir que sólo deja pasar luz de la longitud de onda indicada para excitar la muestra (GFP). Luego posee un espejo dicróico (DM) (orientado en 45° al filtro de excitación) cuya función es dirigir la luz de excitación (λ menor) a la muestra, dejar pasar haces de luz con longitudes de ondas mayores (505 nm) hacia el filtro barrera y reflejar cualquier haz de excitación de vuelta a la lámpara. Finalmente, posee un filtro barrera (BA) pasa

banda entre 515-555 nm, por lo que bloqueará las emisiones hacia la izquierda (azul) y a la derecha (amarillo-rojo) de estas longitudes de onda (<http://test.chroma.com>).

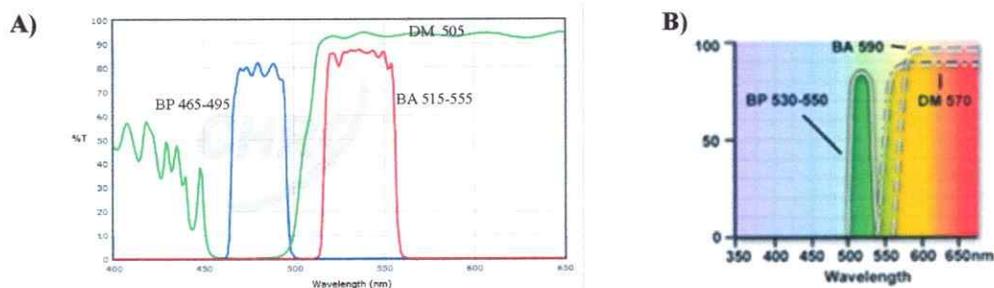


Figura 36. Diagrama de los filtros de fluorescencia utilizados en este trabajo. A) Filtro U-N31001 (haz azul) (<http://test.chroma.com>). B) Filtro U-MNG (haz verde). BP: Filtro excitación pasa banda; BA: filtro barrera pasa banda; DM: espejo dicroico (<http://www.olympusmicro.com>)

Debido a que la longitud de onda de absorción del GFP, el cual posee dos máximos uno a 385 nm y otro 470 nm (<http://www.cryst.bbk.ac.uk>), también excita a la clorofila a y b; al utilizar este filtro es posible separar la fluorescencia emitida del GFP de la clorofila. Esto se debe a que el filtro barrera pasa banda, bloqueará cualquier emisión de fluorescencia proveniente de la clorofila; cuyo espectro de emisión máximo es 650 nm para la clorofila b (<http://omlc.ogi.edu>) y 670 nm para la clorofila a (<http://omlc.ogi.edu>); dejando pasar sólo la fluorescencia proveniente del GFP (515-550 nm) que tiene un máximo a 509 nm y un hombro a 540 nm (<http://www.cryst.bbk.ac.uk>).

El filtro UMNG permitirá separar la emisión de fluorescencia proveniente de la clorofila y del GFP, pues posee un filtro barrera pasa alto, que permitirá pasar la luz emitida sólo sobre los 590 nm, rango en el que emiten las clorofilas, pero bloqueará cualquier emisión verde proveniente del GFP (<http://www.olympusmicro.com>).

Es importante mencionar que el filtro U-N31001 excita al GFP en el pico menor de sus dos máximos (470 nm), el cual es considerablemente menor al de 385 nm

(<http://www.cryst.bbk.ac.uk>), por lo que esto influirá en la intensidad de la fluorescencia obtenida.

En la figura 30 se observa que la proteína PSY2 de *D.carota* fusionada en el extremo C-terminal a GFP, para no enmascarar el péptido de tránsito a cloroplasto propio de la proteína, se destina correctamente a plastidios. El tamaño de estos organelos que fluorescen es aproximadamente de 5 μm , lo que concuerda con lo registrado en la literatura para plastidios (<http://botanydictionary.org>); así como el elevado número observado y la distribución en el borde celular, pues la mayor parte de la célula vegetal está ocupada por la vacuola. Esta intensidad de fluorescencia no se observa en las muestras transformadas con el vector sin inserto y concuerdan a la perfección con la fluorescencia emitida por la clorofila. Es posible observar manchas de fluorescencia difusas, los que corresponden a plastidios fluoresciendo en distintos planos, lo que se comprobó moviendo el micrométrico, ya que son cortes de aproximadamente 200-300 μm .

Para el análisis *in silico* de la localización subcelular de la proteína PSY2 (Tabla 5) se decidió utilizar diferentes programas bioinformáticos, ya que los algoritmos varían significativamente y así se obtienen resultados más confiables. En todos los programas utilizados se obtuvo una localización cloroplástica, lo que refuerza los resultados obtenidos *in vivo* en las microscopías.

Algo similar ocurrió con la proteína PT::CRTI de *X. dendrorhous* donde se puede observar en la figura 35 que la fusión C-terminal con GFP, dirige a la proteína a los plastidios, observándose un patrón de fluorescencia en el borde de las células en múltiples organelos de aproximadamente 5 μm , lo que concuerda con el tamaño y el

número esperado. Aquí existe un “background” un poco mayor, pero se debe a que el corte quedó un poco más grueso, por ende hay más planos de plastidios que fluorescen. De todas formas, se nota una gran diferencia con el control negativo, donde se observan los plastidios por la fluorescencia de la clorofila pero no así con el haz azul. Se realizó un control negativo adicional para comparar la fluorescencia de GFP sin péptido de tránsito, donde se observa un patrón citoplasmático y no nuclear, pues el núcleo en estas células es muy difícil de observar debido a los múltiples planos celulares.

El análisis *in silico* (Tabla 5) entregó una localización cloroplástica para cinco de los seis programas utilizados, pero el programa Epi-Loc arrojó un puntaje levemente superior para la localización citoplasmática. Esta leve diferencia (13%) no es altamente significativa y se explica pues el algoritmo utilizado por este programa atribuye la localización de acuerdo a la de los tres mejores homólogos, método HomoLoc (<http://epiloc.cs.queensu.ca>). Debido a que la mayor parte de los aminoácidos de la proteína PT::CRTI, son parte de una proteína citoplasmática de levadura (CRTI), es esperable que el resultado al utilizar los mejores tres homólogos (probablemente bacterianos) arrojen una localización citoplasmática.

Los programas Wolf e Y-loc son mucho más confiables en este sentido pues analizan motivos presentes en la proteína templado y el número de veces que estos motivos están presentes en las proteínas cloroplásticas, citoplasmáticas, nucleares, mitocondriales, del retículo, de la vía secretoria, entre otros. Estos programas predijeron una localización cloroplástica para la proteína en cuestión. En especial el programa Y-loc indica que la secuencia aminoácidica posee un motivo GO típico de cloroplastos, 26% de las proteínas de éste lo presentan y sólo el 1% de las del núcleo y las mitocondria

lo exhiben. Por otro lado posee un extremo N-terminal apenas negativo, 62% de las proteínas del cloroplasto presentan esta característica y sólo un 5% de las del citoplasma la exhiben (<http://abi.inf.uni-tuebingen.de>).

Estos resultados junto con la de los otros tres programas utilizados apoyan la localización cloroplástica y refuerzan los resultados obtenidos *in vivo* con las microscopías de fluorescencia.

Es importante destacar que en la ingeniería metabólica de plantas, se suelen utilizar genes con una baja homología de secuencias nucleotídicas, en orden de eliminar el riesgo de co-supresión debido al silenciamiento génico. El gen *psy2* de *D. carota* presenta un 77,6% de homología con las secuencias nucleotídicas de las tres PSY descritas en *Malus domestica* (Cerdeira et al., 2012). Por otro lado el gen *crtI* presenta una homología mucho menor (40,0%), al provenir de una levadura como *X. dendrorhous*. Ambos genes están por debajo del porcentaje necesario para generar un silenciamiento, lo que fortalece su uso para aumentar el contenido de carotenoides en manzana.

Si bien los resultados obtenidos en este seminario verifican la funcionalidad transcripcional de los vectores diseñados así como la correcta síntesis y localización de las proteínas PSY2 y PT::CRTI, la funcionalidad de las enzimas codificadas por las secuencias optimizadas para *M. domestica* deben ser analizadas mediante transformaciones estables de frutos y análisis del contenido de carotenoides.

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas en este seminario de título son las siguientes:

- Se diseñó y generó un vector binario propio (pCP), libre de operar, el cual posee dentro de los bordes LB y RB un sitio múltiple de clonamiento, la resistencia a espectinomicina en bacterias y el marcador de selección *bar* en plantas.
- Usando herramientas bio-informáticas se logró optimizar las secuencias codificantes de los genes *psy2* de *D. carota* y *crtI* de *X.dendrorhous* al uso de codones de *Malus domestica*. Estas secuencias fueron usadas para generar construcciones que servirán para elevar el contenido de carotenoides de forma fruto-específica en manzanas, cuya funcionalidad se demostró bio-informáticamente.
- Análisis moleculares de RT-PCR de frutos de tomate y manzana transformados transitoriamente con los vectores de interés, permitieron demostrar la funcionalidad transcripcional de los vectores pCP:*psy2* y pCP:*psy2:crtI*; verificando de esta forma la funcionalidad del promotor PG de tomate en manzana y el correcto diseño bio-informático de las construcciones.
- Mediante microscopías de epifluorescencia, se logró comprobar la correcta destinación de las proteínas PSY2 y PT::CRTI a los plastidios de frutos de tomate transformados transitoriamente, paso clave para aumentar la síntesis de carotenoides en frutos. Además, esto permitió indirectamente verificar la funcionalidad traduccional de las construcciones diseñadas.

Proyecciones:

- Como proyecciones, se plantea el uso de estos vectores para transformar establemente *S. lycopersicum* y analizar el contenido de carotenoides de los frutos, en orden de verificar la funcionalidad enzimática *in planta* de las proteínas PSY2 y PT::CRTI, cuya secuencia codificante fue optimizada a *Malus domestica*.
- Finalmente, los vectores obtenidos en este seminario de título se utilizarán para transformar establemente manzanas, cuyo protocolo de transformación genética ya fue estandarizado, con el fin de aumentar el contenido de carotenoides en su pulpa, de forma fruto-específica.

6. BIBLIOGRAFIA

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, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Aguayo, F. 2010. Construcción y verificación funcional de vectores para sobre-expresar MdSDH, una sorbitol deshidrogenasa de manzana e implementar un sistema de transformación estable de tomate. Seminario de Título, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Ahrens, M.J. y Huber, D.J. 1990. Physiology and firmness determination of ripening tomato fruit. *Physiol. Plant.* **78**: 8-14.

Ampomah-Dwamena, C., Dejnopratt, S., Lewis, D., Sutherland, P., Volz, R. y Allan, A. 2012. Metabolic and gene expression analysis of apple (*Malus × domestica*) carotenogenesis. *Journal of Experimental Botany* **63**: 4497-4511.

Araya, J. 2011. Análisis bioquímico para la determinación de la actividad enzimática de VvSDH1, una posible sorbitol deshidrogenasa de *Vitis vinifera* (vid). Seminario de Título, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Arce, P. Mayo de 2011. El caso de la resistencia a la salinidad. Curso de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Armstrong, G. y Hearts, J. 1996. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *The FASEB J.* **10**: 228-237.

Atkinson, R., Bolitho, K., Wright, M., Iturriagaitia-Bueno, T., Reid, S. y Ross, G. 1998. Apple ACC-oxidase and polygalacturonase: ripening-specific gene expression and promoter analysis in transgenic tomato. *Plant Molecular Biology.* **48**: 449-460.

Beyer, P., Al-Babili, S., Ye, X., Lucca, P., Schaub, P., Welsch, R. y Potrykus, I. 2002. Golden Rice: Introducing the β -Carotene Biosynthesis Pathway into Rice Endosperm by Genetic Engineering to Defeat Vitamin A Deficiency. *The Journal of Nutrition.* **132**: 506S-510S.

Cerda, A., Díaz, G. y Stange, C. 2012. Identificación y análisis de expresión de genes carotenogénicos en manzanos Fuji (*Malus x domestica* cv. *Fuji*). Presentación libre panel. I Congreso Nacional de Estudiantes de Biotecnología. Chile.

Cho, Y. J. y Gil, B. 2004. A Quantified Index for Rapid Evaluation of Starch Content in Apples. *Key Engineering Materials*. **270-273**: 1032-1037.

Cong, L., Wang, C., Chen, L., Liu, H., Yang, G. y He., G. 2009. Expression of phytoene synthase1 and carotene Desaturase crtI Genes Result in an Increase in the Total Carotenoids Content in Transgenic Elite Wheat (*Triticum aestivum L.*). *J. Agric. Food Chem.* **57**: 8652-8660.

DellaPenna, D., Kates, D.S. y Bennett, A.B. 1986. Molecular cloning of tomato fruit polygalacturonase: Analysis of polygalacturonase mRNA levels during ripening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**: 6420-6424.

DellaPenna, D., Lincoln, J.E., Fischer, R.L. y Bennett, A.B. 1989. Transcriptional analysis of polygalacturonase and other ripening associated genes in Rutgers, rin, nor, and Nr tomato fruit. *Plant Physiol.* **90**: 1372-1377.

Diretto, G., Al-Babili, S., Tavazza, R., Beyer, P. y Giuliano, G. 2007. Metabolic Engineering of Potato Carotenoid Content through Tuber-Specific Overexpression of Bacterial Mini-Pathway. *Plos one*. **2**: e350.

Fraser, P., Truesdale, M., Bird, C., Schuch, W. y Bramley, P. 1994. Carotenoid Biosynthesis during Tomato Fruit Development (Evidence for Tissue-Specific Gene Expression). *Plant Physiol.* **105**: 405-413.

Fraser, P., Romer, S., Shipton, C.A., Mills, P.B., Kiano, J.W., Misawa, N., Drake, R.G., Schuch, W. y Bramley, P. 2002. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*. **99**: 1092-1097.

Fraser, P. y Bramley, P. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res.* **43**: 228-65.

Fray, R., Wallace, A., Fraser, P., Valero, D., Hedden, P., Bramley, P. y Grierson, D. 1995. Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *The Plant Journal* **8**: 693-701.

Fuentes, P., Pizarro, L., Moreno, J.C., Handford, M., Rodriguez-Concepcion, M. y Stange, C. 2012. Light-dependent changes in plastid differentiation influence carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant Mol Biol.* **79**: 47-59.

Giovannoni, J.J., DellaPenna, D., Bennett, A.B. y Fischer, R.L. 1989. Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic rin (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. *Plant Cell.* **1**: 53-63.

Giuliano, G., Tavazza, R., Diretto, G., Beyer, P. y Taylor, M.A. 2008. Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Biotechnol.* **26**: 139-145.

Gouy, M. y Gautier, C. 1982. Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucleic Acids Res.* **10**: 7055-7074.

Gustafsson, C., Govindarajan, S. y Minshull, J. 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol.* **22**: 346-353.

Hajdukiewicz, P., Svab, Z. y Maliga, P. 1994. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol.* **25**: 989-994.

Handford, M. 5 de Abril de 2011. Modificación del metabolismo primario en plantas. Curso de biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Hentschel, V., Kranl, K., Hollmann, J., Lindhauer, M.G., Bohm, V. y Bitsch, R. 2002. Spectrophotometric determination of yellow pigment content and evaluation of carotenoids by high-performance liquid chromatography in durum wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **50**: 6663-6668.

Higuera, I., Felix, L. y Goycoolea, F. 2006. Astaxanthin a review of its chemistry and applications. *Crit. Rev. Food Sci Nutr.* **46**: 185-196.

Howitt, C. y Pogson, B. 2006. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell and Environment.* **29**: 435-445.

Ikemura, T. 1981. Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system. *J. Mol. Biol.* **151**: 389-409.

Janssen, B., Thodey, K., Schaffer, R., Alba, R., Balakrishnan, L., Bishop, R., Bowen, J., Crowhurst, R., Gleave, A., Ledger, S., McArney, S., Pichler, F., Snowden, K. y Ward, S. 2008. Global gene expression analysis of apple fruit development from the floral bud to ripe fruit. *BMC Plant Biology.* **8**: 1-29.

Karimi, M., Inzé, D. y Depicker, A. 2002. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science.* **7**: 193-195.

Kirk, J.T. y Tilney-Bassett, R.A. 1978. Proplastids, etioplasts, amyloplasts, chromoplasts and other plastids. En S.T. Kirck & R.A. Tilney-Bassett (eds.), *The Plastids: Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance.* pp 217-223. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Klee, H. 2008. Plant biology: Hormones branch out. *Nature.* **455**: 176-177.

Krinsky, N. y Johnson, E. 2005. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med.* **26**: 459-516.

Landrum, J. y Bone, R. 2001. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Arch. Biochem. Biophys.* **385**: 28-40.

Lincoln, J.E., Cordes, S., Read, E. y Fischer, R.L. 1987. Regulation of gene expression by ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 2793-2797.

Lindgren, L., Stålberg, K. y Hoglund, A. 2003. Seed-Specific Overexpression of an Endogenous Arabidopsis Phytoene Synthase Gene Results in Delayed Germination and Increased Levels of Carotenoids, Chlorophyll, and Abscisic Acid. *Plant Physiology.* **132**: 779-785.

Lithwick, G., y Margalit, H. 2003. Hierarchy of sequence-dependent features associated with prokaryotic translation. *Genome Res.* **13**: 2665-2673.

Maass, D., Arango, J., Wust, F., Beyer, P. y Welsch, R. 2009. Carotenoid Crystal Formation in Arabidopsis and Carrot Roots Caused by Increased Phytoene Synthase Protein Levels. *Plos One.* **4**: e6373.

Mansson, P.E., Hsu, D. y Stalker, D. 1985. Characterization of fruit specific cDNAs from tomato. *MOI. Gen. Genet.* **200**: 356-361.

Mayne, S.T. 1996. β -carotene, carotenoids and disease prevention in humans. *Faseb J.* **10**: 690-701.

Medina, M. C. Marzo de 2011. Biotecnología Plantas Leñosas. Curso de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Meisel, L., Fonseca, B., González, S., Baeza-Yates, R., Cambiazo, V., Campos, R., González, M., Orellana, A., Retamales, J. y Silva, H. 2005. A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses. *Biol Res.* **38**: 83-88.

Mina, J. 2011a. Boletín frutícola avance enero a octubre 2011. Publicación de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (Odepa). <http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servicios-informacion/Boletines/BFruticola1211.pdf>. [Consultada: 20 de Enero de 2012].

Mina, J. 2011b. Mercado de la manzana. Publicación de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (Odepa). <http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/publicaciones/doc/4096.pdf>. [Consultada: 20 de Enero de 2012].

Misawa, N., Yamano, S., Linden, H., de Felipe, M.R., Lucas, M., Ikenaga, H. y Sandmann, G. 1993. Functional expresión of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthesis gene *crtl* in transgenic plants showing an increase of β -caroteno biosynthesis activity and resistance to the bleaching herbicide norflurazon. *The Plant Journal*. **4**: 833-840.

Montgomery, J., Pollard, V., Deikman, J. y Fischer, R. 1993. Positive and Negative Regulatory Regions Control the Spatial Distribution of Polygalacturonase Transcription in Tomato Fruit Pericarp. *The Plant Cell*. **5**: 1049-1062.

Moreno, J.C. 2012. Caracterización funcional del gen licopeno B ciclase 1 (*lcyb1*) de *Daucus carota* (zanahoria) mediante un aumento en sus niveles de expresión en modelos vegetales. Tesis de Magíster, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Naik, P., Chanemougasoundharam, A., Khurana, S. y Kalloo, G. 2003. Genetic manipulation of carotenoid pathway in higher plants. *Current Science*. **85**: 10- 25.

Nambara, E. y Marion-Poll, A. 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**: 165-185.

Niklitschek, M., Alcaíno, J., Barahona, S., Sepúlveda, D., Lozano, C., Carmona, M., Marcoleta, A., Martínez, C., Lodato, P., Baeza, M., Cifuentes, V. 2008. Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol. Res.* **41**: 93-108.

Paine, J., Shipton, C.A., Chaggar, S., Howells, R.M., Kennedy, M.J., Vernon, G., Wright, S.Y., Hinchliffe, E., Adams, J.L., Silverstone, A.L. y Drake, R. 2005. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology*. **23**: 482- 487.

Panfili, G., Fratianni, A. y Irano, M. 2004. Improved normal-phase high-performance liquid chromatography procedure for the determination of carotenoids in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**: 6373–6377.

Peng, Y.B. y Zhang, D.P. 2000. Ultrastructure of Epidermis and Flesh of the Developing Apple Fruit. *Acta Botanica Sinica*. **42**: 794-802.

Perlak, F., Fuchs, R., Dean, D., Mcpherson, S. y Fischhoff, D. 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**: 3324–3328.

Pizarro, L. 2008. Estudio de la función del gen licopeno B-ciclase (*lcyb*) en la biosíntesis de carotenoides en *Daucus carota*. Tesis de Magíster, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Puigbo, P., Guzmán, E., Romeu, A. y García, S. 2007. OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic Acid Research*. **35**: 126-131.

Rodríguez, A., Gas, E. y Rodríguez-Concepción, M. 2009. Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal*. **60**: 424-435.

Rodríguez-Saiz, M., De la Fuente, J. y Barredo, J. 2010. *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**: 645-658.

Romer, S., Fraser, P., Kiano, J.W., Shipton, C.A., Misawa, N., Schuch, W. y Bramley, P. 2000. Elevation of provitamin A content of transgenic tomato plants. *Nature Biotechnol.* **18**: 666-669.

Rosales, M. 19 de Abril de 2011. Resistencia biótica en plantas, Curso de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Rosas, C. 2012. Caracterización molecular y funcional del gen carotenogénico licopeno b-ciclasa 2 (*lcyb2*) de *Daucus carota* (zanahoria). Tesis de Magister, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Sandmann, G. 2001. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies, problems and achievements. *Trends Plant Sci.* **6**: 14-17.

Schroeder, W. y Johnson, E. 1993. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 907-912.

Schuch, W., Kanczler, J., Robertson, D., Hobson, G., Tucker, G., Grierson, D., Bright, S. y Bird, C. 1991. Fruit quality characteristics of transgenic tomato fruit with altered polygalacturonase activity. *HortScience*. **26**: 1517-1520.

Schwartz, S., Tan, B., Gage, D., Zeevaart, J. y McCarty, D. 1997. Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science*. **276**: 1872-1874.

Sheehy, R.E., Pearson, J., Brady, C.J. y Hiatt, W.R. 1987. Molecular characterization of tomato fruit polygalacturonase. *MOI. Gen. Genet.* **208**: 30-36.

Shewmaker, C., Sheehy, J., Daley, M., Colburn S., y Ke, D. 1999. Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *The Plant Journal*. **20**: 401-412.

Thompson, C.J., Movva, N.R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J.E., Lauwereys, M. y Botterman, J. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *Embo J.* **6**: 2519-2523.

Verwoerd, T.C., Dekker, B.M. y Hoekema, A. 1989. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Research*. **17**: 2362.

Yu, J., et al. 2002. A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa L. ssp. indica*). *Science*. **296**: 79-92.

Zhu, C., Naqvi, S., Breitenbach, J., Sandmann, G., Christou, P. y Capell, T. 2008. Combinatorial genetic transformation generates a library of metabolic phenotypes for the carotenoid pathway in maize. *PNAS*. **105**: 18232-18237.

Zhu, C., Naqvi, S., Capell, T., y Christou, P. 2009. Metabolic engineering of ketocarotenoid biosynthesis in higher plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **483**: 182-190.

Citas de Internet:

Abramowitz, M. y Davidson, M. Microscopy resource center Olympus. <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/filters.html> [Consultada: 21 de Septiembre de 2012].

Armstrong, W.P. Botany 115 Terminology Fruit Terminology Part 4. <http://waynesword.palomar.edu/termfr4.htm> [Consultada: 11 de Septiembre de 2012].

Biofrutales. http://www.biofrutales.cl/investigadores_ri.html [Consultada: 21 de Enero de 2012].

Briesemeister, S., Rahnenführer, J. y Kohlbacher, O. 2010. YLoc. <http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/YLoc/webloc.cgi>. [Consultada: 20 de Agosto de 2012].

Chroma Technology Corporation. <http://test.chroma.com/product/custom-and-clearance/reclaimed-cubes/NC322148>. [Consultada: 20 de Septiembre de 2012].

Dictionary of Botany. 2003. <http://botanydictionary.org/chloroplast.html>. [Consultada: 22 de Septiembre de 2012].

GeneScript USA Inc. 2002. <http://www.genscript.com>. [Consultada: 15 de Diciembre del 2011].

Integrated DNA Technologies, Inc. <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>. [Consultada: Noviembre del 2011-Agosto del 2012]

Invitrogen. <http://www.invitrogen.com/1/1/11554-pcr-8-gw-topo-ta-cloning-kit.html> [Consultada: 17 de Octubre del 2012].

Jewell, T. 1996. Economic and environmental implications of herbicide resistance. <http://archive.greenpeace.org/geneng/reports/gmo/gmo008.htm>
[Consultada: 27 de Septiembre de 2012].

Jobling, J. 2000. Postharvest Ethylene: A critical factor in quality management. Sydney Postharvest Laboratory Information Sheet. <http://www.postharvest.com.au/EthylenePDF>.
[Consultada: 11 de Septiembre de 2012].

Jonda, S. 1996. The Chromophore of GFP. <http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/projects/jonda/chromoph.htm>.
[Consultada: 21 de Septiembre de 2012].

Magein, H. y Leurquin, D. 2000. ISHS Acta Horticulturae 517: XXV International Horticultural Congress, Part 7: Quality of Horticultural Products. Changes in amylose, amylopectin and total starch content in jonagold apple fruit during growth and maturation. http://www.actahort.org/books/517/517_62.htm. [Consultada: 22 de Septiembre de 2012].

Nakamura, Y. Codon Usage Database. 2007. <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=3750>. [5 de Noviembre de 2011].

National Center for Biotechnology Information, Primer Blast. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)
[Consultada: Noviembre del 2011-Agosto del 2012]

Prahl, S. Oregon Medical Laser Center. <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/123.html>
<http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/125.html>
[Consultada: 21 de Septiembre de 2012].

Puigbo, P. 2005. Optimizer: A web server utility that optimize a DNA or Protein sequence. <http://genomes.urv.es/OPTIMIZER>. [Consultada: 20 de Octubre del 2011].

Queen's, University. EpiLoc. <http://epiloc.cs.queensu.ca/>
[Consultada: 20 de Agosto de 2012].

Softberry. 2007. <http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesh&group=programs&subgroup=gfind>. [Consultada: 20 de Noviembre del 2011].

The Arabidopsis Information Resource (TAIR). <http://www.arabidopsis.org/jsp/common/image.jsp?id=1698&format=jpg>.
[Consultada: 17 de Octubre del 2012].

Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries. <http://www.thermoscientificbio.com/webtools/doubledigest/> [Consultada: Noviembre del 2011-Agosto del 2012].

ANEXOS

Malus x domestica [gbpln]: 567 CDS's (163086 codons)

fields: [triplet] [frequency: per thousand] ([number])

UUU 18.3(2978)	UCU 16.1(2627)	UAU 12.9(2096)	UGU 7.3(1183)
UUC 19.6(3200)	UCC 15.4(2508)	UAC 22.1(3603)	UGC 10.7(1747)
UUA 6.9(1128)	UCA 11.9(1948)	UAA 2.1(349)	UGA 0.9(140)
UUG 22.0(3589)	UCG 6.8(1107)	UAG 0.5(78)	UGG 11.0(1789)
CUU 20.8(3400)	CCU 14.4(2343)	CAU 12.0(1952)	CGU 4.3(701)
CUC 20.4(3329)	CCC 11.0(1795)	CAC 12.8(2086)	CGC 4.7(773)
CUA 5.6(920)	CCA 14.9(2436)	CAA 15.3(2488)	CGA 4.1(676)
CUG 12.5(2034)	CCG 8.1(1324)	CAG 16.3(2652)	CGG 4.2(693)
AUU 25.7(4198)	ACU 14.1(2307)	AAU 20.4(3323)	AGU 11.3(1835)
AUC 24.7(4032)	ACC 19.3(3155)	AAC 26.0(4246)	AGC 16.1(2627)
AUA 9.6(1568)	ACA 12.8(2093)	AAA 23.1(3766)	AGA 11.4(1865)
AUG 21.5(3511)	ACG 5.5(890)	AAG 44.8(7305)	AGG 11.1(1817)
GUU 22.7(3707)	GCU 25.2(4106)	GAU 30.2(4923)	GGU 20.6(3366)
GUC 16.4(2675)	GCC 20.1(3286)	GAC 24.2(3945)	GGC 19.0(3098)
GUA 6.7(1085)	GCA 19.0(3096)	GAA 30.8(5019)	GGA 22.2(3626)
GUG 21.6(3520)	GCG 7.5(1215)	GAG 36.9(6018)	GGG 13.4(2191)

Coding GC 47.97% 1st letter GC 51.80% 2nd letter GC 39.47% 3rd letter GC 52.63%

Anexo 1. Tabla del uso de codones de *Malus domestica*. Se ilustra la preferencia en el uso de codones de 567 CDS. (<http://www.kazusa.or.jp>)

psy2 D.c.-psy2 D.c. optimizado.apr

					Section 1	
Translation of pPG-psv2 optimizado-nos	(1)	1	10	20	30	48
Translation of pPG-psy2-nos	(1)	MSVAMSWIVTPSLEVSNCFCYLETAREGTRVLDPSRLGSRDKNMRCGG				
						Section 2
Translation of pPG-psv2 optimizado-nos	(49)	49	60	70	80	96
Translation of pPG-psy2-nos	(49)	RLEKQKLRKRWSSKSFNAEYSYSCLGGSELENGSIFPVHSSMVVSADGD				
						Section 3
Translation of pPG-psv2 optimizado-nos	(97)	97	110	120	130	144
Translation of pPG-psy2-nos	(97)	MAVSSEKRVYDVVLKQAALVKRQFRSDEELEVKPEMILPGTLLSLLSEA				
						Section 4
Translation of pPG-psv2 optimizado-nos	(145)	145	150	160	170	180
Translation of pPG-psy2-nos	(145)	YDRCGEVCAEYAKTFYLGTLTLPERRRAIWAIYVMCRRTDELVDGPN				
						Section 5
Translation of pPG-psv2 optimizado-nos	(193)	193	200	210	220	230
Translation of pPG-psy2-nos	(193)	ASHITPSALDRWELRLEDLFRGRPFDM LDAALS DTVMKFPVDIQFFRD				
						Section 6
Translation of pPG-psv2 optimizado-nos	(241)	241	250	260	270	288
Translation of pPG-psy2-nos	(241)	MIEGMRNDLKRKRYKRFDELVLYCYVAVAGTVGLMSVPIMGIAPNSQAT				
						Section 7
Translation of pPG-psv2 optimizado-nos	(289)	289	300	310	320	336
Translation of pPG-psy2-nos	(289)	TESVYNAALALGLANQLTNILRDVGEDARRGRVYLPQDELAQAAGLSDE				
						Section 8
Translation of pPG-psv2 optimizado-nos	(337)	337	350	360	370	384
Translation of pPG-psy2-nos	(337)	DIEAGKVIDKWRNFMKKQIKRARMFFDEAQIGVRELSPASRWPVWASL				
						Section 9
Translation of pPG-psv2 optimizado-nos	(385)	385	390	400	410	420
Translation of pPG-psy2-nos	(385)	LLYRQILDIEIEANDYNNFTKRAYVSKPKKILALPVAYAKAFAPTARTS				
						Section 10
Translation of pPG-psv2 optimizado-nos	(433)	433	439			
Translation of pPG-psy2-nos	(433)	STFLKT-				

Anexo 2. Alineamiento aminoacídico entre la proteína predicha por el programa FGGENESH 2.6, para la construcción *pPG::psy2 optimizado::nos* y la proteína PSY2 de *D. carota* traducida a partir de la secuencia nucleotídica original.

pt-crtI, PT- crtI optimizado.apr

					Section 1		
Translation of Pt ::crtI	(1)	1	10	20	30	40	52
Translation of Pt::crtI optimizado	(1)	MASMISSSAVTIVSRASRQQAAYAPFGGLKSMTCFVYKRVNIDITSIISNG					
							Section 2
Translation of Pt ::crtI	(53)	53	60	70	80	90	104
Translation of Pt::crtI optimizado	(53)	GRVKCMGKEQDQDKPTAIIIVGCCIGGIATAARLAKEGFQVTVFEKNDYSGGH					
							Section 3
Translation of Pt ::crtI	(105)	105	110	120	130	140	156
Translation of Pt::crtI optimizado	(105)	CSLIERDGYRFDQGPSLLLPDLFKQTFEDLGEKMEQVVDLICEPNYVCHP					
							Section 4
Translation of Pt ::crtI	(157)	157	170	180	190		208
Translation of Pt::crtI optimizado	(157)	HDEETFTLSDMALLKREVERFEKDGDFDRFLSFIQEAHRHYELAVVHVLDQ					
							Section 5
Translation of Pt ::crtI	(209)	209	220	230	240	250	260
Translation of Pt::crtI optimizado	(209)	NFPQFAAFRLRQFIQQLALHPPESIWIWVCRVYFKIDRLRRVFSFAVNYMGQ					
							Section 6
Translation of Pt ::crtI	(261)	261	270	280	290	300	312
Translation of Pt::crtI optimizado	(261)	SPYSAPGTYSLLQYTELTGIGWYPRGGFWQVPMILLQIVKRNNSAKFNFA					
							Section 7
Translation of Pt ::crtI	(313)	313	320	330	340	350	364
Translation of Pt::crtI optimizado	(313)	PVSQVLLSPAKDRATGVRLESCEEHHDVVIIVNADLVYASEHLIPDDARNKI					
							Section 8
Translation of Pt ::crtI	(365)	365	370	380	390	400	416
Translation of Pt::crtI optimizado	(365)	QQLGEVKRSWNADLVGGKLLKQSCSSLSFYNSMDRIVDGLGHHNIFLAEDFK					
							Section 9
Translation of Pt ::crtI	(417)	417	430	440	450		468
Translation of Pt::crtI optimizado	(417)	GSPDTIFEELGLPADPSPFYVNVPSRIDPSAAPEGKDAIVILVPCGHIDASNP					
							Section 10
Translation of Pt ::crtI	(469)	469	480	490	500	510	520
Translation of Pt::crtI optimizado	(469)	QDYNKLVARARKFVIHTLSAKLGLPQFERMVAEKVHDAPSWEKEFNLDKGS					
							Section 11
Translation of Pt ::crtI	(521)	521	530	540	550	560	572
Translation of Pt::crtI optimizado	(521)	ILGLAHNFMQVLGFRPSTRHPKYDKLFFVGASTHPGTGVPIVLGAKLTANQ					
							Section 12
Translation of Pt ::crtI	(573)	573	580	590	600	610	624
Translation of Pt::crtI optimizado	(573)	VLESFDRSPAPDPNMSLSVPTYCKPLKSNGTGIDSQVQLKFMDLERNVYLLVH					
							Section 13
Translation of Pt ::crtI	(625)	625	630	640			
Translation of Pt::crtI optimizado	(625)	LIGAVIARSVGVLAFL-					

Anexo 3. Alineamiento aminoacídico entre la proteína predicha por el programa FGENESH 2.6, para la construcción *pPG::pt::crtI optimizado::nos* y la proteína PT::CRTI de *X. dendrorhous*, traducida a partir de la secuencia nucleotídica original.