

UCH-FC  
Biotecnología  
P.695  
C.4



Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

Construcción de vectores para Silenciamiento Génico  
Post-Transcripcional de la familia de genes que codifican  
para la enzima licopeno  $\beta$  ciclasa de *Daucus carota*.

Seminario de Título

Entregado a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por

Lorena Andrea Pizarro Arcos

Marzo, 2007

Santiago – Chile



Director de Seminario de Título: Dra. Claudia Stange Klein



**“CONSTRUCCIÓN DE VECTORES PARA SILENCIAMIENTO GENICO POST-  
TRANSCRIPCIOAL DE LA FAMILIA DE GENES QUE CODIFICAN PARA LA  
ENZIMA LICOPENO  $\beta$  CICLASA DE *Daucus carota*”**

**Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de  
los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.**

**LORENA PIZARRO ARCOS**

*Dra. Claudia Stange Klein*  
**Directora Seminario de Título**

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece decir "Claudia", sobre una línea horizontal.

**Comisión de Evaluación Seminario de Título**

*Dra. Margarita Carú*  
**Presidente Comisión**

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece decir "Margarita", sobre una línea horizontal.

*Dr. Víctor Cifuentes Guzmán*  
**Corrector**

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece decir "Victor", sobre una línea horizontal.



Santiago de Chile, Octubre de 2007



Nací en Coquimbo un 9 de Junio de 1983. Hija de Antonia y Gabriel, y hermana menor de Gabo. Viví y crecí hasta los 17 años en una parcela en zona de La Cantera, Coquimbo, donde crecieron y se conocieron mis padres.

Mis estudios comenzaron en el jardín infantil Ma. Auxiliadora de La Serena. Luego, en primero básico ingrese al Colegio Inglés Católico de La Serena donde cursé toda mi educación básica y media. Aquí descubrí mi pasión por la biología y mis ganas de aprender, esto se tradujo en lo que más me gusta que es la investigación y la ciencia. En el año 2001, el destino afortunadamente me trajo a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile cuando ingrese a esta carrera, donde he vivido grandes experiencias y conocido gente maravillosa. Espero que en mi futuro siga aprendiendo de ciencia, de la vida; y seguir acompañada de personas que me quieren.

*"Hay siempre en el alma humana  
Una pasión por ir a la caza de algo"*

*Charles Dickens (1812-1870).*

*A mis padres*



## AGRADECIMIENTOS

Es difícil empezar a agradecer porque todas las personas que quiero me han ayudado a terminar este proceso. Muchos me ayudaron directamente, otros de manera indirecta pero no menos importante.

Por eso comenzaré agradeciendo a los compañeros y amigos de mi vida como estudiante. Primero, a mis grandes amigas del Colegio, a Claudia (CHP), la Paulina, Mery y Ma. José, quienes empezaron a enseñarme lo que es la amistad, algo que aún estoy aprendiendo. A los inolvidables amigos de la Universidad con los que pase buenos momentos y los que aguantaron mi, a veces, muy mal carácter y migrañas varias: Cintilla, Rodrigo, Cata-elfa, Andrecito. Especial mención merecen esos grandes amigos con los que sufrí estudiando *all night long* y que me enseñaron y explicaron tantas cosas: Mauro y Solange. Debo recalcar mis agradecimientos a la Sole y Cintilla por adoptarme cada vez que lo necesité.

A los integrantes del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal por el grato ambiente que generan. En especial los amigos que encontré en el laboratorio que siempre me apoyan, en especial cuando los experimentos y presentaciones no van bien. Entre ellos, a Pato estrella, por la alegría; a la Pauli, por la sensibilidad, ternura, y cariño sincero; Isa, por esas geniales conversaciones ñoñas; Claudia H., por la sonrisa; a Carlos F. por ser un gran compañero, a mis compañeros de Grupo, que son tantos, a Carlos S. y por supuesto también a la Ange, por estar siempre dispuesta a ayudarme en un amplio sentido. A Barbarilla (y cia.) que siempre entendió mi sentido de humor y lo compartió. También agradezco al Seba por la constante disposición, al Profe Mike y Profe Liliana por los consejos. A la Profe, mi tutora, por todo lo que he aprendido bajo su dirección, por la confianza, cariño y por todo el apoyo que me dio aunque no era su labor hacerlo, esto siempre lo agradeceré.

Agradezco a mi familia, que hizo posible esto. A mamá por darme la fuerza y tranquilidad cuando la necesité, a mi papá por entenderme y quererme siempre, al Gabo por ser un gran hermano y a mi viejita por su amor incondicional que siempre me acompaña.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	3
Hipótesis de Trabajo	8
1.1. Objetivo General	9
1.2 . Objetivos Específicos	9
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	10
<b>2.1 Materiales</b>	10
2.2.1 Material Biológico	10
2.2.2 Medios de Cultivo	10
2.1.3 Reactivos	10
<b>2.2 Métodos</b>	11
2.2.1. Preparación de <i>Escherichia coli</i> , cepa DH5 $\alpha$ competentes con CaCl <sub>2</sub> .	11
2.2.2. Transformación de <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ competentes.	11
2.2.3. Preparación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa GV3101 competente.	12
2.2.4. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	12
2.2.5. Extracción de RNA de tejido vegetal.	12
2.2.6. Electroforesis de RNA en geles de agarosa-formaldehido.	13
2.2.7. Amplificación de un fragmento de Icyb mediante RT-PCR.	13
2.2.7.1. Transcripción Reversa.	13
2.2.7.2. Diseño de partidores.	14



2.2.7.3. RT-PCR de un fragmento del gen <i>lcyb</i> .	14
<b>2.2.8. Minipreparación de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>.</b>	15
<b>2.2.9. Minipreparación de DNA plasmidial por Kit comercial.</b>	16
<b>2.2.10. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.</b>	16
<b>2.2.11. Clonación del fragmento <i>lcyb</i> en el vector pGEM-T easy</b>	16
<b>2.2.12. Determinación de clones de DH5<math>\alpha</math> transformados.</b>	17
2.2.12.1. Análisis Rápido de Colonias.	17
2.2.12.2. Análisis por PCR.	17
2.2.12.3. Análisis por digestión enzimática.	18
<b>2.2.13. Construcción del vector PUCpSS-<i>lcyb</i>.</b>	18
<b>2.2.14. Construcción de los vectores pBIN19/L-S, pBIN19/L-AS y pBIN19/L-ASD.</b>	19
<b>3. RESULTADOS</b>	21
<b>3.1. Amplificación de un fragmento conservado de <i>lcyb</i> a partir de cDNA de <i>Daucus carota</i>.</b>	21
<b>3.2. Clonación del fragmento amplificado de 494 pb de <i>lcyb</i> en el vector pGEM-T easy.</b>	21
<b>3.3. Construcción del vector binario para silenciar post-transcripcionalmente los genes de <i>lcyb</i> en <i>Daucus carota</i>.</b>	26
3.3.1. Construcción del vector PUCpSS/ <i>lcyb</i> .	26
3.3.2. Construcción de los vectores binarios pBIN19/L-S, pBIN19/L-AS y pBIN19/L-ASD para SGPT de los genes que codifican para LCYB de <i>D. carota</i> .	30
<b>3.4 Tranformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con los vectores de SGPT de <i>lcyb</i> totales.</b>	34
<b>4. DISCUSIÓN</b>	36



5. CONCLUSION	45
6. BIBLIOGRAFIA	46



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ruta de síntesis de carotenoides en plantas.	4
Figura 2	RT-PCR del fragmento de <i>lcyb</i> de <i>Daucus carota</i> .	21
Figura 3	Esquema de clonamiento del fragmento <i>lcyb</i> en el vector pGEMT easy.	22
Figura 4	Análisis rápido de colonias de la transformación con pGEM-T/ <i>lcyb</i> .	23
Figura 5	PCR de DNAs plasmidial de los clones pGEM-T/ <i>lcyb</i> 1 y 2.	23
Figura 6	Digestión enzimática con <i>EcoRI</i> de los clones pGEM-T/ <i>lcyb</i> 1 y 2.	24
Figura 7	Análisis de la secuencia del vector pGEM-T/ <i>lcyb</i> 2.	25
Figura 8	Esquema de clonamiento del fragmento <i>lcyb</i> en el vector PUCpSS.	26
Figura 9	Digestión de los vectores PUCpSS/ <i>lcyb</i> con <i>EcoRI</i> .	28
Figura 10	Digestión de los vectores PUCpSS/ <i>lcyb</i> con <i>HindIII</i> .	28
Figura 11	Esquema del constructo de expresión 35Sd/ <i>lcyb</i> /TCaMV.	29
Figura 12	Vectores PUCpSS, PUCpSS/ <i>LcybS</i> y PUCpSS/ <i>LcybAS</i> .	30
Figura 13	Esquema del constructo 35d/ <i>lcyb</i> /TCaMV en el vector binario pBIN19.	32
Figura 14	PCR de clones transformados con pBIN19/L-S o pBIN19/L-AS.	33
Figura 15	Digestión de los vectores pBIN19/L-S, pBIN19/L-AS y pBIN19/L-ASD con la enzima de restricción <i>HindIII</i> .	33
Figura 16	Esquema vectores binario pBIN19/L-S, pBIN19/L-AS, pBIN19/L-ASD.	34
Figura 17	PCR de colonia a partir de clones de <i>A. tumefaciens</i> transformados con los vectores para SGPT pBIN19/L-S, pBIN19/L-AS y pBIN19/L-ASD.	35



INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Secuencia de Partidores utilizados.	15
---------	-------------------------------------	----



## LISTA DE ABREVIATURAS

35Sd: Promotor 35S doble del virus del mosaico de la coliflor

abRNA: RNA aberrante

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BrEt: Bromuro de Etidio

C $\beta$ HX:  $\beta$  caroteno hidroxilasa

C $\epsilon$ HX:  $\epsilon$  caroteno hidroxilasa

CaMV: Virus del mosaico de la coliflor

cDNA: DNA complementario

CIAP: Calf Intestine Alkaline Phosphatase

DEPC: Dietilpirocarbonato

D.O.: Densidad óptica

DMAPP: Dimetil alil pirofosfato

DNasa: Desoxi-ribonucleasa

dsRNA: RNA de doble hebra

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

GGPPS Geranilgeranil pirofosfato isomerasa:

IPI: Isopentenil pirofosfato isomerasa

IPP: Isopentenil pirofosfato

LB: Luria Bertani

LCYB: Licopeno  $\beta$  ciclasa

LCYE: Licopeno  $\epsilon$  ciclasa

MOPS: Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico

MVA: Ácido mevalónico

mRNA: RNA mensajero

NTR: Región no traducible

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PSY: Fitoeno sintasa

RNasa: Ribonucleasa

RT: Transcripción Reversa

S/RT: Reacción sin transcriptasa reversa

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SGPT: Silenciamiento Génico Post-Transcripcional

siRNA: RNA pequeño interferente

TCaMV: Terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor

UV: Ultravioleta

Z-CDS:  $\xi$  – caroteno desaturasa

ZEP: Zeaxantina epoxidasa

## RESUMEN

Los carotenoides son pigmentos lipídicos sintetizados en cromoplastos y cloroplastos de frutos, flores y órganos fotosintéticos de plantas. Los genes carotenogénicos se expresan en órganos verdes y durante la maduración de frutos son inducidos preferentemente a nivel transcripcional en presencia de luz. A diferencia de otros modelos, la síntesis de  $\beta$ -caroteno en la raíz de *Daucus carota* L. (zanahoria) ocurre en oscuridad. Plantas de *D. carota* acumulan grandes cantidades del carotenoide  $\beta$ -caroteno en la raíz modificada. Sin embargo, no existen estudios sobre la regulación de la síntesis de carotenoides en esta planta.

La síntesis de  $\beta$ -caroteno, el principal carotenoide producido en la raíz modificada de zanahoria, está a cargo de las enzimas IPI, GGPP, PSY, PDS, Z-CDS y LCYB. En la base de datos (NCBI) se encuentra publicada la secuencia completa del gen DQ192190 que codifica para licopeno  $\beta$  ciclasa (LCYB), enzima que se encuentra directamente involucrada en la síntesis de  $\beta$ -caroteno. Además, existe una secuencia parcial de cDNA que codifica para una enzima con actividad LCYB y recientemente se publicaron dos secuencias parciales de otros cDNAs de LCYB a partir de fruto de *D. carota*. Nuestro grupo está interesado en estudiar la función del gen *lcyb* DQ192190 mediante silenciamiento génico post-transcripcional (SGPT). Para comenzar a dilucidar la regulación de la síntesis de carotenoides en *D. carota*, en este seminario de título se construyeron los vectores binarios derivados del vector pBIN19 con un constructo compuesto por el promotor doble 35SCaMV, un fragmento conservado de los genes *lcyb* y el terminador CaMV para gatillar el SGPT de la posible familia génica que codifica para LCYB en *D. carota*. Se obtuvieron construcciones que poseen el fragmento de *lcyb* (494 pb) en sentido (35Sd/*lcyb*S/TCaMV) y en antisentido (35Sd/*lcyb*AS/TCaMV) respecto al promotor 35SCaMV. Además, se obtuvo una construcción que tiene el cassette de *lcyb* en antisentido y en duplicado (35Sd/*lcyb*AS/TCaMV//35Sd/*lcyb*AS/TCaMV). Las construcciones generadas permitirán iniciar el estudio funcional del gen *lcyb* DQ192190 en *D. carota*.

## ABSTRACT

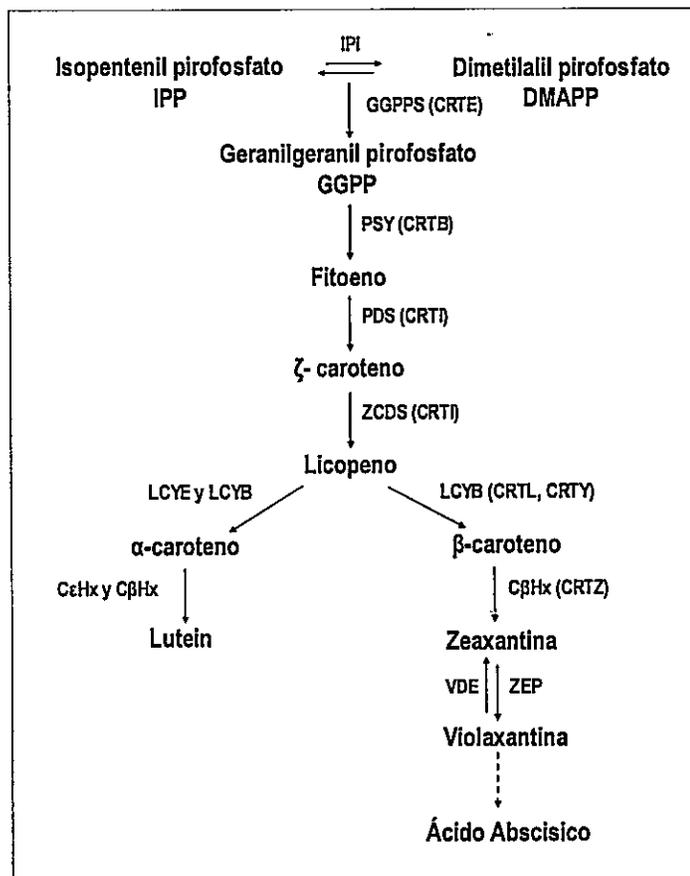
Carotenoids are lipidic pigments synthesized in chromoplasts and chloroplasts of fruits, flowers and photosynthetic organs of plants. Carotenogenic gene expression in green organs and during fruit ripening is induced by light, especially at the transcriptional level. Unlike most organisms, the  $\beta$ -carotene is synthesized and accumulated in the modified root of *Daucus carota* L. (carrot) in darkness. Up to day the effect of the light in the regulation of the synthesis of carotenoids in this plant has not been studied.

The  $\beta$ -carotene, the main carotenoid that accumulates in the modified root of carrot, is produced by the enzymes IPI, GGPP, PSY, PDS, Z-CDS and LCYB. The complete sequence of the gene DQ192190 that codifies for lycopene  $\beta$  cyclase (LCYB) is published in the data base (NCBI), where also three partial sequences of others LCYB cDNAs from fruit of *D. carota* have been published. The lycopene  $\beta$  cyclase (LCYB) enzyme is directly involved in the  $\beta$ -carotene synthesis and our group is interested to study the function of the gene *lcyb* DQ192190 by means of post-transcriptional gene silencing (PTGS). To begin the study about the regulation of the carotenoid synthesis in *D. carota*, three binary vectors derived from pBIN19 were designed to trigger PTGS of LCYB genes in this plant. The constructs are composed by a double 35SCaMV promoter; a 494 bp conserved fragment, present in all genes with LCYB activity and the CaMV terminator. The constructs obtained in this work carried the fragment of *lcyb* gene in sense (35Sd/*lcyb*S/TCaMV) or in antisense (35Sd/*lcyb*AS/TCaMV) orientation respect to 35SCaMV promoter. Additionally, we obtained a construction with the antisense cassette cloned in duplicate in pBIN19 vector (35Sd/*lcyb*AS/TCaMV//35Sd/*lcyb*AS/TCaMV). The constructions generated will allow us to initiate the functional study of *lcyb* DQ192190 gene in *D. carota* plants.

## 1.- INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides ampliamente distribuidos en la naturaleza, responsables de la mayoría de los colores amarillos y rojos en flores y frutos (Fraser y Bramley, 2004). Se dividen en carotenos y xantofilas. Los carotenos son cadenas lipídicas de 40 carbonos con enlaces insaturados conjugados que pueden presentar extremos cíclicos. Las xantofilas son derivados de los carotenos que poseen átomos de oxígeno en sus anillos terminales. Los carotenoides son sintetizados por plantas, algas, levaduras, bacterias fotosintéticas y algunas bacterias no fotosintéticas. En plantas son precursores de la hormona ácido abscísico, participan en la fotosíntesis y en procesos de fotoprotección. Además, actúan como antioxidantes protegiendo las moléculas de DNA, proteínas y lípidos de especies reactivas del oxígeno. Se ha postulado que dentro de los efectos dañinos provocados por el daño oxidativo en células animales y que son contrarrestados por los carotenoides, se encuentran la activación y progresión de enfermedades crónicas, entre ellas cáncer, enfermedades cardiovasculares y daño visual (Mordi, 1993; Bartley y Scolnik, 1995; Snodderly, 1995; Mayne, 1996; Niyogy K. 1999, Fraser y Bramley, 2004; Tapiero y cols., 2004; Tanumihardjo y Yang, 2005). Por otra parte, algunos carotenoides como  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno, son precursores de moléculas importantes para la fisiología animal como son el ácido retinoico y la vitamina A (Krinsky y cols., 1994; Schwartz y cols., 2003).

La síntesis de carotenoides en plantas superiores se realiza en los plastidios. Comienza con la formación de una molécula de 5 carbonos: el isopentenil pirofosfato (IPP). Esta molécula es generada a través de dos rutas, la vía del ácido mevalónico (MVA) y la vía MVA-independiente. La molécula de IPP isomeriza a dimetilalil pirofosfato (DMAPP) mediante la acción de la enzima IPP isomerasa (IPI) (Figura 1). Posteriormente, tres moléculas de IPP son condensadas con una molécula de DMAPP por la geranylgeranyl pirofosfato sintasa (GGPPS), para generar una molécula de 20 carbonos, el geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) (Fig 1). En la



**Figura 1. Ruta de síntesis de carotenoides en plantas.**

El isopentenil pirofosfato (IPP) precursor de la ruta de carotenogénesis, se sintetiza por dos vías: La ruta independiente de ácido mevalónico que involucra la participación de la enzima 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS) y la ruta del ácido mevalónico en la que participa la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa (HMGR). Una vez formado el IPP y su isómero el dimetilalil pirofosfato (DMAPP), por la acción de la enzima isopentenil pirofosfato isomerasa (IPI), éstos son condensados para formar el geranilgeranil pirofosfato (GGPP), reacción que es catalizada por la enzima geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPPS). Luego, dos moléculas de GGPP son utilizadas para formar fitoeno mediante la acción de la enzima fitoeno sintasa (PSY). El fitoeno sufre desaturaciones a cargo de las enzimas fitoeno desaturasa (PDS) y  $\zeta$ -caroteno desaturasa (z-CDS) para formar licopeno. El licopeno puede ser ciclizado por las enzimas licopeno  $\beta$  ciclasa (LCY $\beta$ ) y licopeno  $\epsilon$  ciclasa (LCY $\epsilon$ ) para generar  $\beta$ -caroteno o  $\alpha$ -caroteno. Luego estas moléculas pueden ser hidroxiladas por enzimas como C $\beta$ Hx y C $\epsilon$ Hx para dar origen a zeaxantina y luteína. A partir de zeaxantina se sintetiza violaxantina por la acción de la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP). La violaxantina dará origen al ácido abscísico.

siguiente etapa dos moléculas de GGPP reaccionan cola a cola para formar fitoeno (Fig 1), reacción que es catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY). Luego, esta molécula de 40 carbonos es blanco de una serie de desaturaciones para dar origen al licopeno. Estas desaturaciones son catalizadas por dos enzimas, primero la fitoeno desaturasa que da origen a un intermediario el  $\xi$ -caroteno (Fig 1) y luego sobre este intermediario actúa la  $\xi$ -caroteno desaturasa ( $\xi$ -CDS) generando licopeno. Posteriormente, el licopeno es transformado en dos moléculas bicíclicas  $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -caroteno. El primero se produce a partir de la ciclación de ambos extremos de la molécula de licopeno por acción de la licopeno  $\beta$  ciclasa (LCYB). El  $\alpha$ -caroteno se produce por la ciclación de un extremo del licopeno por la acción de la licopeno  $\epsilon$  ciclasa (LCYE) y el otro anillo es formado por la LCYB. El  $\beta$ -caroteno sintetizado es utilizado como sustrato de la enzima caroteno  $\beta$ -hidroxilasa (C $\beta$ Hx) para producir zeaxantina, molécula precursora para la síntesis de ácido abscísico (ABA). Mientras que la hidroxilación del  $\alpha$ -caroteno producirá la luteína a través de la acción de la enzima C $\beta$ Hx y  $\epsilon$ -caroteno hidroxilasa (C $\epsilon$ Hx) (Fig. 1).

Los genes carotenogénicos se encuentran codificados en el núcleo y su regulación ha sido motivo de estudio hace varias décadas, especialmente en procesos de maduración de frutos, en el desarrollo de la coloración en flores y la transición de etioplastos a cloroplastos dependiente de la luz (Römer et al., 2005). En modelos de maduración de frutos y de transición de etioplasto a cromoplastos dependiente de la luz se ha observado una regulación positiva de la luz sobre la biosíntesis de carotenoides, la cual activa preferentemente la expresión transcripcional de los genes carotenogénicos (Schofield y Paliyath, 2005; Simkin y cols., 2003; Woitsch y Römer, 2003).

En la maduración del fruto de tomate, se observa un aumento de la concentración de carotenoides entre 10 y 14 veces, alcanzando 3.454  $\mu$ g/g de carotenoides de peso fresco (Fraser y cols., 1994; Fraser y Bramley, 2004). En tomate, se ha descrito que los genes *psy1* y *psy2* codifican para la fitoeno sintasa. El primero es expresado en tejido no fotosintético, como

es el fruto de tomate, mientras que *psy2* sólo es expresado en tejido fotosintético (Bartley y Scolnik, 1993). Por otra parte, en *A thaliana* existen 6 genes que codifican para la enzima GGPPS. Se ha descrito que GGPPS1 se expresa de manera ubicua, GGPPS2 y GGPPS4 en flores y GGPPS3 en raíz (Okada y cols., 2000; Zhu y cols., 1997).

Durante el proceso de maduración de tomate, se observa un aumento de los transcritos de los genes *dxs*, *pds* y *psy1*, al mismo tiempo que disminuye la expresión *lcyb* y *lcye* (Fraser y cols., 1994; Pecker y cols., 1996; Ronen y cols., 1999; Lois y cols., 2000). Estos cambios en la expresión génica regulan la acumulación de licopeno en el fruto de tomate. En el año 2001, Hirschberg identificó dos genes que codifican para licopeno  $\beta$  ciclasa en tomate, los que llamó *cyc $\beta$*  y *lcy $\beta$* . El primero, participa en la biosíntesis de carotenoides en cromoplastos y el segundo en cloroplastos presente en órganos fotosintéticos. En *Capsicum annuum*, el gen de *lcy $\beta$*  se expresa de manera constitutiva durante el desarrollo del fruto (Hugueney y cols., 1995). En esta especie la biosíntesis de carotenoides se detiene en oscuridad debido principalmente al bajo nivel de mensajero de *psy* y *pds*; y en menor grado por los genes de la *z-cds* y *lcyb* (Simkin y cols., 2003). La vía de síntesis de carotenoides, también es regulada por inhibición por producto final. Al inhibir la ciclación del licopeno en tomate se observa un aumento la expresión de *pds* y *psy* (Giuliano y cols., 1993; Corona y cols., 1996).

En hojas de tomate y de *Arabidopsis thaliana* se ha reportado que al pasar de un tratamiento de baja intensidad lumínica a un tratamiento de alta intensidad lumínica, se aumenta 5 veces la expresión de *lcyb* (Hirschberg, 2001). Además, en *Arabidopsis thaliana* durante el proceso de de-etiolación aumenta la expresión de *psy*, gen de copia única, mientras que la expresión de los genes *ggpps* y *pds* se mantienen constantes (von Lintig y cols., 1997; Welsch y cols., 2000). Esto nos indica que para la activación de la síntesis de carotenoides en la de-etiolación en *A. thaliana* es necesaria la activación transcripcional del gen *psy*. Estudios del promotor del gen *psy* indican que este gen se encuentra activo a niveles basales en oscuridad, y es activado por sobre estos niveles en tratamientos con diferentes tipos de luz (Welsch y cols., 2003). En *Nicotiana tabacum* se ha observado que al exponer plantas etioladas a luz roja, azul y

blanca aumenta la expresión de los genes carotenogénicos, así, *psy* presenta un aumento dependiente de luz roja, indicando un control por fitocromo (Woitsh y Römer, 2003; von Lintig y cols., 1997). Por otra parte, la expresión de licopeno  $\beta$  ciclasa,  $\beta$ -caroteno hidroxilasa y violaxantina de-epoxidase es inducida en presencia de luz roja (Woitsh y Römer, 2003). Esta regulación positiva de la producción de carotenoides y de expresión de los genes carotenogénicos también ha sido observada en otros organismos fotosintéticos como algas. Un ejemplo de esto se observa en el alga *Chlamydomonas reinhardtii* en el cual los genes *psy* y *pds* presentan una rápida inducción en respuesta a la luz, debido a la activación transcripcional de estos genes (Bohne y Linden, 2002). En el alga, *Haematococcus pluvialis* se ha visto que altas intensidades de luz provocan un incremento transitorio del mRNA de *psy*, *pds* y de la hidroxilasa de los carotenoides, seguido de una leve acumulación de la xantofila llamada astaxantina (Steinbrenner y Linden, 2003; Steinbrenner y Linden, 2001).

A pesar de los grandes avances en cuanto a la regulación de la expresión de genes carotenogénicos en plantas y en microorganismos, no se ha determinado el tipo de regulación que existe en modelos de plantas que tengan una alta producción de carotenoides en ausencia de luz, como es la raíz modificada o de reserva de zanahoria (*Daucus carota*). La raíz de zanahoria es una excelente fuente de carotenoides alcanzando a acumular 11 mg de carotenoides por gramo de tejido fresco. El 77% de los carotenoides totales corresponde a  $\beta$ -caroteno, el principal carotenoide en la raíz modificada de zanahoria (Fraser y Bramley, 2004). Actualmente, en la base de datos (NCBI) se encuentran los cDNAs de la mayoría de los genes carotenogénicos de *D. carota*: 4 secuencias de cDNAs que codifican para la actividad enzimática LCYB, tres secuencias de cDNA para PSY y C $\beta$ Hx, 2 cDNAs para Z-CDS y GGPP y solo 1 secuencia de cDNA para IPI, PDS, LCYE y ZEP (Fonseca, 2000; Just y cols., 2006). De las 4 secuencias de cDNA de LCYB una de ellas DQ192190 (*lcyb2*) corresponde al único cDNA completo de *lcyb* descrito hasta la fecha y no existen estudios de expresión de este gen durante la síntesis de  $\beta$ -caroteno en *D. carota*. Los otros cDNAs, *lcyb3* (AM181169) y *lcyb4* (AM181168), son secuencias parciales obtenidas recientemente a partir de fruto de *D. carota*, y

lcyb1 (AF208531) que poseen un 94%, 98% y 95% de identidad con el gen lcyb DQ192190, respectivamente.

En resumen, en frutos y órganos fotosintéticos la mayoría de los genes carotenogénicos son activados transcripcionalmente por luz, se ha observado que en plantas como tomate y *A. thaliana* existe más de un gen carotenogénico que codifica para una misma actividad enzimática y que además se expresan de manera órgano específica. Por otro lado, *D. carota* sintetiza  $\beta$ -caroteno en órganos fotosintéticos (hojas) y en la raíz modificada bajo condiciones de luz y oscuridad, respectivamente. Además, se ha reportado la presencia de 4 secuencias de cDNA para LCYB, 2 de ellas obtenidas a partir de frutos zanahoria. Es por ello que nosotros creemos que las secuencias descritas para lcyb pueden corresponder a genes diferentes que podrían expresarse mayoritariamente en hojas o raíces (expresión órgano específica). Para abordar esta pregunta evaluaremos el rol del gen lcyb (DQ192190) en la síntesis de  $\beta$ -caroteno en hojas y raíces utilizando la técnica de silenciamiento génico post-transcripcional (SGPT) del gen lcyb DQ192190 en *D. carota*. En la presente memoria de investigación se construyeron vectores binarios que permitirán la transformación de plantas con el constructo generado mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Así, utilizando estos vectores se insertará en el genoma de plantas de *D. carota* los constructos que contienen un fragmento conservado de los genes que codifican para la enzima LCYB controlado bajo el promotor constitutivo fuerte 35SCaMV. Este vector permitirá transformar plantas de *D. carota* y silenciar todos los posibles genes lcyb que se encuentran en la planta de zanahoria. Los resultados obtenidos mediante el SGPT de los genes lcyb serán utilizados como control del silenciamiento y comparados con los resultados de SGPT específico del gen DQ192190. Esto permitirá validar los resultados del estudio funcional del gen DQ192190 de lcyb.

### **1.1.- Objetivo**

“Construcción de vectores para silenciamiento génico post-transcripcional (SGTP) de los genes que codifican para licopeno  $\beta$  ciclasa de *D. carota*”.

### **1.2.- Objetivos específicos**

1. Amplificación y clonación de un fragmento conservado de los genes que codifican para LCYB a partir de cDNA de *Daucus carota*.
2. Construcción del vector binario para silenciar post-transcripcionalmente los genes que codifican para LCYB en *Daucus carota*.

## 2.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. MATERIALES

#### 2.1.1. Material Biológico.

- *Escherichia coli* cepa DH5 $\alpha$ :

F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80d*lacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), *phoA*, *supE44*,  $\lambda$ <sup>-</sup>, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

- *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101:

C58, plásmido TI curado, Gen<sup>R</sup>, Rif<sup>R</sup>.

#### 2.1.2. Medios de Cultivo.

- Medio LB: 2% triptona; 0,8% NaCl.

- Medio LB-agar: 2% triptona; 0,8% NaCl, 1,6% agar.

#### 2.1.3. Reactivos.

Todos los reactivos utilizados son de calidad para biología molecular y/o calidad para análisis obtenidos de Merck, Sigma-Aldrich, US Biological, Phyto Technology Laboratories, Promega, Axygen, Omega Bio-tek, Fermentas, New England Biolabs e Invitrogen.

## 2.2. MÉTODOS.

### 2.2.1. Preparación de *Escherichia coli*, cepa DH5 $\alpha$ competentes con CaCl<sub>2</sub>.

Se inoculó 100  $\mu$ L de DH5 $\alpha$  en 3 mL de medio LB y se incubó a 37°C con agitación toda la noche (16 horas). Se tomó 750  $\mu$ L del cultivo de noche y se inoculó 100 mL de LB, se mantuvo a 37°C con agitación hasta que alcanzó una D.O.<sub>600</sub> = 0,4 - 0,5. Luego, se centrifugó a 3.000 g durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado de células se resuspendió rápida y suavemente en 50 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M estéril y frío. Se centrifugó a 2.000 g por 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 10 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M estéril y frío. Se incubó 30 minutos a 4°C. Posteriormente, se centrifugó por 5 minutos a 2.000 g a 4°C y el precipitado se resuspendió en 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M estéril y frío, eliminando previamente el sobrenadante. Una vez resuspendidas, las células quedan listas para ser utilizadas o guardadas en glicerol 30% de glicerol a -80°C en alícuotas de 200  $\mu$ L. Todo el procedimiento se debe realizar manteniendo la esterilidad.

### 2.2.2. Transformación de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ competentes.

Se descongeló una alícuota de 200  $\mu$ L de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes, preparadas según 2.2.1 y se agregó aproximadamente 50 ng del vector de interés. Se mantuvo en hielo por 45 minutos. Luego se le dió un golpe térmico de 42°C durante 1,5 minutos y puso en hielo por 1 minuto. Se agregó 1 mL de LB y se dejó 1 hora en agitación a 37°C. Luego de este tiempo se plaqueó en LB-agar con el antibiótico adecuado para la selección de las colonias transformadas. Las placas se incubaron a 37°C por toda la noche. Para la selección de los clones transformados con el vector pGEM-T easy o PUCpSS se suplementó el medio LB-agar con 100 mg/L de ampicilina y para el vector pBIN19 se suplementó con 50 mg/L de kanamicina.

### **2.2.3. Preparación de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 competente.**

Se inoculó *A. tumefaciens* de la cepa GV3101 en 5 mL de LB rifampicina 10 mg/L para la selección cromosomal y gentamicina 50 mg/L para seleccionar el plásmido Ti. Se incubó a 28°C toda la noche con agitación. Luego, se inoculó 4 mL del cultivo de *A. tumefaciens* en 100 mL de LB, con la misma concentración de antibióticos, y se incubó a 28°C con agitación hasta una D.O.<sub>600</sub> = 0,5. Luego, se incubó en hielo por 10 minutos. Se centrifugó a 3.000 g por 20 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante con cuidado y el precipitado fue resuspendido en 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 20 mM estéril y frío. Se hicieron alícuotas de 100 µL y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Las alícuotas se guardaron a -80°C hasta su utilización.

### **2.2.4. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.**

Se descongeló en hielo una alícuota de 100 µL de células de *A. tumefaciens* competentes, preparadas según 2.2.3. Se agregó 500 ng del vector binario y se congeló en nitrógeno líquido por 5 minutos. Luego se dejó descongelar a temperatura ambiente por 15 minutos. Se agregó 1 mL de LB y se incubó a 28°C toda la noche con agitación. Posteriormente, se plaqueó 50 µL del cultivo en un medio de LB-agar con antibióticos (rifampicina 10 mg/L, gentamicina 50 mg/L. Para seleccionar el vector binario se utiliza kanamicina 50 mg/L) y se incubó a 28°C durante 40 horas. Las colonias transformantes se analizaron mediante PCR (2.2.12.2).

### **2.2.5. Extracción de RNA de tejido vegetal.**

Para la extracción de RNA de hojas de tabaco y de raíz de *Daucus carota* se utilizó el reactivo RNA-Solv Reagent de Omega Bio-tek siguiendo las indicaciones del productor. Luego, el RNA se visualizó en un gel de agarosa-formaldehído. Se realizó todo el procedimiento en hielo para evitar la denaturación del RNA.

### **2.2.6. Electroforesis de RNA en geles de agarosa-formaldehído.**

El RNA extraído fue separado en un gel de agarosa al 1%, formaldehído al 3% y amortiguador MOPS al 1X. Para preparar el gel se disolvió la agarosa en agua con calor hasta que quedó una solución homogénea. Luego se agregó la cantidad adecuada de buffer MOPS al 5X (200 mM de MOPS, CH<sub>3</sub>COONa 50 mM y EDTA 5 mM, a un pH de 7,0) para obtener en el gel una concentración de 1X de este amortiguador. Posteriormente, se agregó bajo campana el formaldehído. La muestra de extracción de RNA se disolvió en un volumen final de 20 a 30  $\mu$ L de buffer de carga que está compuesto de Buffer MOPS a una concentración 1X, formamida 50%, formaldehído 2,2%, ficoll 400 2,5%, azul de Bromofenol y 0,3  $\mu$ g/ $\mu$ L de BrEt. Esta mezcla de RNA y buffer de carga fue denaturada a 65°C por 15 minutos. Todas las soluciones se hicieron con agua libre de RNAsa, tratadas con Dietil pirocarbonato (0,01% DEPC en agitación a 37°C por lo menos durante 4 horas, luego de esto se autoclava a 120°C por 30 minutos). La electroforesis se realizó a un voltaje entre 60 – 70 V, hasta que el frente de corrida avance aproximadamente 6 cm. Luego, se iluminó el gel con luz UV en un transiluminador (Syngene) y la imagen fue capturada con el programa Gene Snap de Syngene. La concentración relativa se determinó mediante el programa Gene Tools de Syngene.

### **2.2.7. Amplificación de un fragmento de Icyb mediante RT-PCR.**

#### **2.2.7.1. Transcripción Reversa.**

Mediante este procedimiento se obtiene el cDNA de simple hebra que es complementario a los RNA mensajeros de la muestra utilizada. Para esto, el RNA obtenido (2.2.5) se sometió a tratamiento con DNAsa I. Se tomó 2  $\mu$ g de RNA y se adicionó 50 unidades de DNAsa I libre de RNAsa (Fermentas), buffer de DNAsa I 1X (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>), 1  $\mu$ L de inhibidor de RNAsa (New England Biolabs), correspondiente a 40 unidades de enzima. Esto se completó con agua DEPC hasta un volumen total de 10  $\mu$ L. Luego, se incubó a 37 °C por 20 minutos. Para inactivar la DNAsa I se agregó 1  $\mu$ L de EDTA 25

mM en agua DEPC. Después de este tratamiento el RNA es utilizado directamente en la síntesis de la hebra complementaria.

Se utilizó la mitad del volumen del RNA tratado con DNAsa I (5,5 µL), correspondiente a 1µg de RNA, se agregó 1 µL de oligo AP (5'TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGCTTCG3') 10 µM en un volumen final de 12 µL, completados con agua DEPC. Esta solución fue puesta en el termociclador a 70°C durante 5 minutos. Pasado este tiempo se puso en hielo por 2 minutos y se agregó 7 µL de una mezcla que contiene 4 µL de buffer 5X de la enzima, 1 µL de dNTP 10 mM disueltos en agua DEPC y 2 µL de agua DEPC. La mezcla se mantuvo 2 minutos a 25°C y se agregó 1 µL de enzima ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega). Posteriormente, se mantuvo a 42°C por 55 minutos y se detuvo la reacción a 70°C durante 10 minutos. En paralelo se realizó un control de la reacción al que no se agregó enzima (S/RT).

#### 2.2.7.2. Diseño de partidores.

Se diseñaron partidores 5'LcybEco y 3'LcybEco (Tabla 1) que amplifican un fragmento de 494 pb que está presente en los cuatro cDNA que codifican para la actividad LCYB de *D. carota* mencionadas (DQ192190, AM181168, AM181169 y AF208531). En los extremos 5' de cada partidador se agregó la secuencia del sitio de restricción de la enzima *EcoRI*. El tamaño esperado de la secuencia amplificada es de 494 pb. Este fragmento posee una baja identidad nucleotídica (menor al 20%) con otros genes de *Daucus carota*.

#### 2.2.7.3. RT-PCR de un fragmento del gen lcyb.

Los cDNAs obtenidos, según lo descrito en 2.2.7.1 se amplificaron mediante PCR con el par de partidores LcybEco, utilizando 2 µL del cDNA como templado. El programa de amplificación comienza con una denaturación inicial a 95°C por 4 minutos. Luego, se realizaron 35 ciclos en los que se repitió una etapa de denaturación a 95°C por 50 segundos, una temperatura de unión de 54°C por 50 segundos y por último una temperatura de elongación de 72°C por 1 minuto. La reacción continuó con una extensión final a 72°C por 8 minutos y

concluyó manteniendo las muestras a 4°C. Cada reacción contenía buffer 1X correspondiente a la Taq polimerasa utilizada, 1 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 0,5 µL de cada partidor a 10 µM y 0,2 µL de enzima, en un volumen total de 25 µL. Además, se realizó la reacción de PCR al control de la reacción de transcripción reversa sin enzima (S/RT) (2.2.5) y un control negativo de la reacción de PCR sin templado (C-).

**Tabla 1: Secuencia de Partidores utilizados.**

Se presentan las secuencias de los partidores utilizados, con su respectiva temperatura de fusión (T<sub>m</sub>), el nombre de origen del gen y el tamaño del fragmento amplificado.

Partidor	Secuencia	T <sub>m</sub> (°C)	Gen	Tamaño Amplificado (pb)
5'LcybEco	5'GAATTCTATGGTGTGGTGGTGGATGGA3'	62	Todos los genes de LCYB de <i>D. carota</i>	494
3'LcybEco	5'GAATTCAGGAATGTAGGGATTTAACTG3'	60		
5' Actina	5'CACACTTTCTACAATGAGCT3'	56	Actina de <i>A. thaliana</i>	695 pb
3' Actina	5'GCAGTGATCTCTTTGCTCAT3'	58		

### 2.2.8. Minipreparación de DNA plasmidial de *E. coli*.

El clon de interés se cultivó durante la noche en 5 ml LB con el antibiótico de selección y se dejó crecer a 37 °C con agitación. Se centrifugó todo el cultivo por 1 minuto a 14.000 rpm, se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el precipitado en 50 µL de LB. Una vez resuspendido el precipitado se agregó 300 µL de solución TENS (Tris 10 mM a pH 7,5, EDTA 1mM, NaOH 0,1 M, SDS 0,5% p/v) y se agitó en vortex por 5 segundos. Se adicionó 150 µL de acetato de sodio 3M a pH 5,2 y se homogenizó vigorosamente por 5 segundos. Luego se centrifugó a 14.000 rpm por 2 minutos y se recuperó el sobrenadante, teniendo la precaución de no tomar parte del precipitado. El sobrenadante fue puesto en un nuevo tubo eppendorf al que se le adicionaron 800 µL de etanol absoluto frío y se invirtió 5 veces. El DNA se precipitó por

centrifugación durante 2 minutos a 14.000 rpm y se eliminó el sobrenadante. El precipitado fue lavado 2 veces agregando 500 µL de etanol 80% y centrifugando a 14.000 rpm por 2 minutos. El precipitado fue secado a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente, fue resuspendido en 30 µL de agua destilada estéril. Se agregaron 4 µL de ribonucleasa A (20 µg/ml) y se incubó a 37 °C por 20 minutos. El DNA plasmidial purificado fue utilizado para análisis de PCR.

#### **2.2.9. Minipreparación de DNA plasmidial por Kit comercial.**

El DNA plasmidial utilizado para las digestiones enzimáticas, transformaciones y secuenciaciones fue purificado por el Kit Axyprep™ Extracción Miniprep de Axygen. Los clones positivos fueron secuenciados en MacroGen Co. (USA); donde se realizó un ciclo terminador BigDye™, luego el producto de la reacción se precipitó y secuenció usando el secuenciador automático 3730x1.

#### **2.2.10. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.**

Los DNAs se visualizaron en geles de agarosa al 1% en buffer TAE al 1X (Tris-base 40 mM, ácido acético glacial 19 mM, EDTA 1 mM) y 3 µg/L de bromuro de etidio (BrEt). Se utilizó TAE 1X como buffer de corrida y el gel fue sometido a electroforesis a 80 V por 20 min. Las bandas de DNA son visualizadas por la fluorescencia emitida por el BrEt, que se intercala en la molécula de DNA, al ser expuesta a la luz UV de un transiluminador. La imagen es fotografiada utilizando el equipo Dark Room Multigenius Syngene y un transiluminador Syngene mediante el programa Gene Snap de Syngene y la fluorescencia es cuantificada por el programa Gene Tools de Syngene. La concentración y tamaño de la muestra de DNA fue determinada mediante un estándar de DNA .

#### **2.2.11. Clonación del fragmento lcyb en el vector pGEM-T easy.**

El producto de RT-PCR de lcyb (2.2.7) fue clonado en el vector pGEM-T easy del kit pGEM-T™ Easy Vector System (Promega), siguiendo las indicaciones del productor. Para ello

se tomaron 5  $\mu$ L del buffer de la T4 DNA ligasa 5X, 0,5  $\mu$ L de vector pGEM-T easy (correspondiente a 25 ng de vector), 2  $\mu$ L de una dilución 2:5 del producto de RT-PCR en un volumen final de 10  $\mu$ L con agua destilada estéril libre de nucleasa. La ligación se mantuvo por 3 horas a temperatura ambiente. Luego, el medio de ligación fue transformado a células DH5 $\alpha$  competentes, según lo descrito en 2.2.5. Las colonias obtenidas se analizaron mediante el método descrito en 2.2.12.1. Los clones positivos fueron guardados a -80°C hasta su utilización.

## **2.2.12. Determinación de clones de DH5 $\alpha$ transformados.**

### **2.2.12.1. Análisis Rápido de Colonias.**

Se preparó un cultivo saturado incubado a 37°C por 16 horas de cada clon en LB con el antibiótico de selección correspondiente.. De este de cultivo se tomaron 150  $\mu$ L, se centrifugó por 3 minutos y se eliminó el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido con 40  $\mu$ L de Buffer de Extracción (Sacarosa 6%, Azul de Bromo Fenol 0,1%). Bajo campana se agregó 14  $\mu$ L de Fenol: Cloroformo (1:1) y se agitó en vortex por 10 segundos. Luego, se centrifugó por 3 minutos a 12.000 rpm. Se tomó entre 10  $\mu$ L y 15  $\mu$ L del sobrenadante y se cargó en un gel de agarosa al 1%. Como control negativo se cargó una alícuota del vector sin inserto, de manera de diferenciar de acuerdo a la migración en el gel los plásmidos con inserto respecto al que no posee inserto.. Este análisis es útil para plásmidos de tamaño pequeño (3.000 – 5.000 pb) e insertos mayores a 400 pb, pues cuando son plásmidos de gran tamaño es difícil observar la diferencia de tamaño en cuanto a la migración en el gel. Este resultado fue validado por PCR o digestión enzimática. Este procedimiento fue utilizado para el análisis de clones transformantes de pGEMT/lcyb y PUCpSS/lcyb.

### **2.2.12.2. Análisis por PCR.**

A DNA plasmidial purificado según lo descrito en 2.2.8 de los clones candidatos obtenidos según 2.2.12.1. se les hizo un PCR bajo las condiciones descritas en 2.2.7.3. Se

utilizaron aproximadamente 100 ng de DNA plasmidial como templado. El producto de la amplificación fue sometido a electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X.

#### 2.2.12.3. Análisis por digestión enzimática.

La digestión enzimática se realizó en un volumen total de 20  $\mu$ L con 250 ng de DNA plasmidial purificado por kit (2.2.9.), 1  $\mu$ L de enzima (10 unidades/ $\mu$ L), buffer 1X de la enzima correspondiente. En el caso del DNA de pGEMT/lcyb la digestión se realizó con *EcoRI* (Fermentas) durante 30 minutos; el DNA de PUCpSS/lcyb (ambas orientaciones) se digirió con *EcoRI* también por 30 minutos; y por último el DNA de pBIN19/L fue digerido durante 4 horas con la enzima *HindIII* (Invitrogen).

#### 2.2.13. Construcción del vector PUCpSS-lcyb.

El fragmento de 494 pb del gen *lcyb* se clonó en el vector PUCpSS en el sitio de restricción *EcoRI* (Figura 8) para fusionarlo al promotor doble 35SCaMV. Por ello se preparó DNA plasmidial del vector pGEM-T/lcyb mediante el kit Pure Yield Plasmid Midiprep System (Promega). Posteriormente, el DNA es digerido con *EcoRI* (Fermentas) de tal modo de obtener suficiente inserto para ser clonado en el vector PUCpSS. Para cada digestión se utilizó 2  $\mu$ g de DNA plasmidial pGEMT/lcyb, 10 unidades de enzima y buffer *EcoRI* 1X en un volumen total de 20  $\mu$ L. Se incubó a 37°C por una hora. De esta forma se liberó un fragmento de 494 pb, el cual fue purificado del gel de agarosa al 1% con el sistema Wizard SV gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Por otra parte, el vector PUCpSS de 3.585 pb fue purificado con el kit Pure Yield Plasmid Midiprep System (Promega), digerido con *EcoRI* (Fermentas) y desfosforilado con la enzima CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) (Fermentas). Para la digestión, se utilizaron 2  $\mu$ g del vector PUCpSS, 10 unidades de *EcoRI* y buffer *EcoRI* 1X en un volumen total de 20  $\mu$ L. La mezcla se mantuvo por 4 horas a 37 °C para obtener una digestión completa. Luego, la enzima fue inactivada a 65°C por 20 minutos, según las indicaciones del productor. Para la

defosforilación se agregó 2 unidades de enzima CIAP al medio de digestión y buffer CIAP 1X en un volumen total de 100  $\mu$ L. Se incubó a 37 °C por 1 hora y luego se inactivó la enzima CIAP a 85°C por 15 minutos. Para obtener el vector digerido y defosforilado se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se purificó la banda de interés con el sistema Wizard SV gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Luego, se realizó la ligación utilizando una relación de inserto y vector de 30:1, con 400 unidades T4 DNA ligasa (New England Biolabs) en un volumen de 12  $\mu$ L. Esta reacción se mantuvo a 16°C por 24 horas. Luego, se transformó el medio de ligación *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes tal como fue descrito en 2.2.2. Algunas de las colonias transformantes seleccionadas en medio LB-agar/ampicilina se analizaron mediante el método descrito en 2.2.12 y posteriormente fueron secuenciadas en Macrogen, Co (USA). De esta forma se determinó la orientación del fragmento *lcyb* en el contexto del promotor. Se seleccionaron dos clones de PUCpSS-*lcyb* uno en sentido (PUCpSS/*lcyb*S) y otro en antisentido (PUCpSS/*lcyb*AS). Estos clones fueron guardados a -80°C hasta su utilización.

#### **2.2.14. Construcción de los vectores pBIN19/L-S, pBIN19/L-AS y pBIN19/L-ASD.**

Aproximadamente 2  $\mu$ g de los clones seleccionados PUCpSS/*lcyb*S y PUCpSS/*lcyb*AS se digirieron con la enzima *Hind*III (Invitrogen), para purificar los constructos 35Sd/*lcyb*S/TCaMV y 35Sd/*lcyb*AS/TCaMV. El DNA plasmidial de los clones se digirió con 10 unidades de *Hind*III (Invitrogen), el buffer correspondiente a una concentración 1X en un volumen final de 30  $\mu$ L y se incubó a 37 °C por 3 horas, liberándose un fragmento de 1.396 pb. Este fragmento está compuesto por el promotor doble 35SCaMV (692 pb) el fragmento ligado de *lcyb* (494 pb) en sentido o en antisentido y el terminador 35SCaMV (210 pb) (Figura 8). Este fragmento fue purificado de un gel de agarosa 1% mediante el uso de Wizard SV gel System de Promega y ligado al vector binario pBIN19 de 11.777 pb.

En paralelo se tomó 2  $\mu$ g del vector binario pBIN19 purificado con el Kit Axyprep<sup>TM</sup> Extraction Miniprep (Axygen) y se digirió utilizando 10 unidades de la enzima de restricción

*Hind*III (Invitrogen), 1X del buffer correspondiente a la enzima en un volumen total de 30  $\mu$ L. Se incubó por 4 horas a 37 °C hasta su completa digestión. Luego, la enzima fue inactivada a 65 °C por 20 minutos. Posteriormente, el plásmido digerido se desfosforiló con la enzima CIAP (Fermentas) tal como se procedió con el vector PUCpSS en 2.2.13.

Para la ligación se utilizó una relación de inserto y vector de 30:1, con 400 unidades T4 DNA ligasa (New England Biolabs) en un volumen de 12  $\mu$ L. Esta reacción se mantuvo a 16 °C por 24 horas y se transformó *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes tal como fue descrito en 2.2.2. Las colonias seleccionadas en el LB-agar/kanamicina se analizaron mediante el método descrito en 2.2.12. Luego de este análisis los clones positivos fueron secuenciados en MacroGen, Co (USA) obteniendo los vectores binarios con los constructos de interés: pBIN19/35Sd/*lcyb*S/TCaMV (pBIN19/L-S), pBIN19/35Sd/*lcyb*AS/TCaMV (pBIN19/L-AS) y pBIN19/35Sd/*lcyb*ASD/TCaMV (pBIN19/L-ASD) que posee el cassette doble 35Sd/*lcyb*AS/TcaMV (figura 10). Los clones fueron guardados a -80°C hasta su utilización.

El DNA plasmidial de estos clones fue purificado según lo descrito en 2.2.9 para la transformación a *Agrobacterium tumefaciens* (descrito en 2.2.4). De esta forma se obtuvieron los vectores binarios con los constructos de interés en *A. tumefaciens* GV3101.

### 3.- RESULTADOS

#### 3.1. Amplificación de un fragmento conservado de *lcyb* a partir de cDNA de *Daucus carota*.

Para la amplificación del fragmento de 494pb de *lcyb* se utilizaron el par de partidores específicos *LcybEco* (Tabla 1). Se purificó RNA de *D. carota* silvestre tal como fue descrito en 2.2.5. Luego, al RNA se le realizó una transcripción reversa (RT), obteniendo los cDNAs de simple hebra complementarios a los RNA mensajeros de la muestra utilizada (2.2.7.1). Con los cDNAs y los partidores *LcybEco* se realizó un RT-PCR, lo que permitió amplificar específicamente el fragmento de 494 pb del gen *lcyb* (Figura 2).

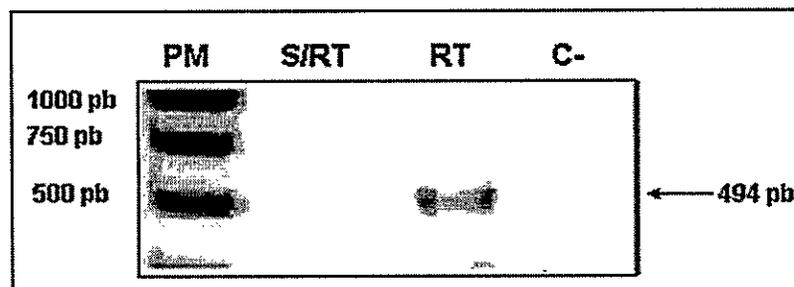
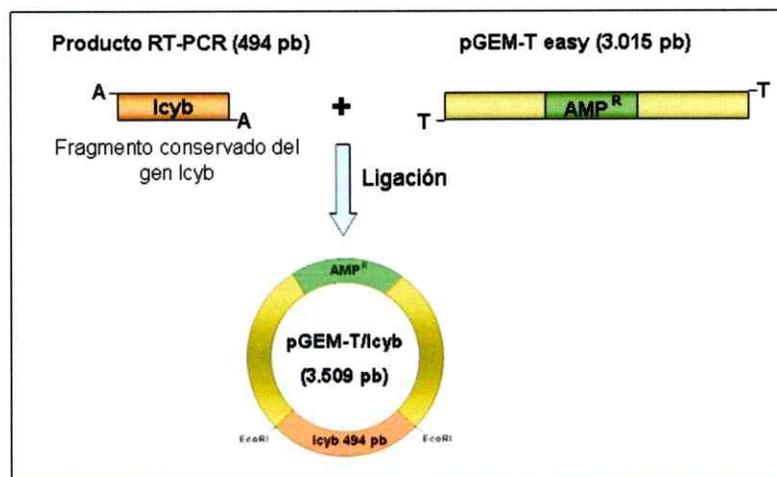


Figura 2. RT-PCR del fragmento de *lcyb* de *Daucus carota*.

Electroforesis de DNA en gel de agarosa al 1%. RT: amplificación del fragmento de *lcyb* de *D. carota*. Se indica el tamaño correspondiente. S/RT: control de transcripción reversa sin adicionar enzima. C-: Reacción de PCR sin templado. PM: Marcador de peso molecular.

#### 3.2. Clonación del fragmento amplificado de 494 pb de *lcyb* en el vector pGEM-T easy.

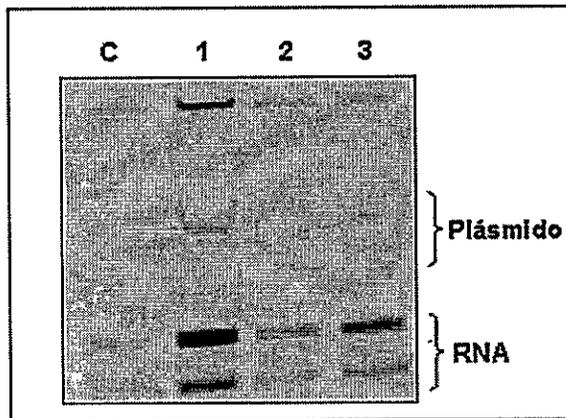
El fragmento de 494 pb de *lcyb* de *D. carota* amplificado por RT-PCR fue clonado en el vector pGEM-T easy (2.2.11), como se muestra en la figura 3. El vector pGEM-T easy es un vector lineal que tiene en el extremo terminal de cada hebra una Timina. El producto de PCR generado por la enzima Taq polimerasa deja en el extremo terminal una Adenina. Esto permite que el fragmento y el vector pGEM-T easy sean ligados en sus extremos cohesivos.



**Figura 3. Esquema de clonamiento del fragmento lcyb en el vector pGEMT easy.**

El fragmento de 494 pb de lcyb de *D. carota* amplificado por RT-PCR fue ligado al vector pGEM-T easy para generar el vector pGEM-T/lcyb. AMP<sup>R</sup>: Resistencia a ampicilina.

Los plasmidios de las células transformadas resistentes a ampicilina se analizaron mediante un análisis rápido de colonias (2.2.12.1.). Este ensayo permite diferenciar los plásmidos recombinantes respecto a los que no poseen inserto de acuerdo a la migración en un gel de agarosa al 1%. Como control se utiliza un vector sin inserto y su migración se compara con la migración de los clones analizados (Figura 4). Si el vector migra menos implica que tiene un mayor tamaño, por lo tanto, podría tener clonado el fragmento de interés. En la figura 4 observamos que los clones 1 y 2 migran menos que el plásmido control, por lo tanto, estos clones, pGEM-T/lcyb 1 y pGEM-T/lcyb 2, probablemente tienen clonado el fragmento de lcyb en el vector pGEM-T easy. El clon 3 no muestra una diferencia detectable en la migración en el gel respecto a C, por lo que no fue utilizado en los análisis posteriores. Estos resultados fueron corroborados por análisis posteriores de PCR y digestión enzimática.



**Figura 4. Análisis rápido de colonias de la transformación con pGEM-T/lcyb.**

Electroforesis de DNA en gel de agarosa al 1% del análisis rápido de 3 colonias transformantes seleccionadas en ampicilina. C: muestra control que corresponde al plásmido pGEM-T easy sin inserto. En 1, 2 y 3 se muestra la migración de los plásmidos de los clones 1, 2 y 3, respectivamente. Se observan dos bandas de mayor migración correspondiente al RNA.

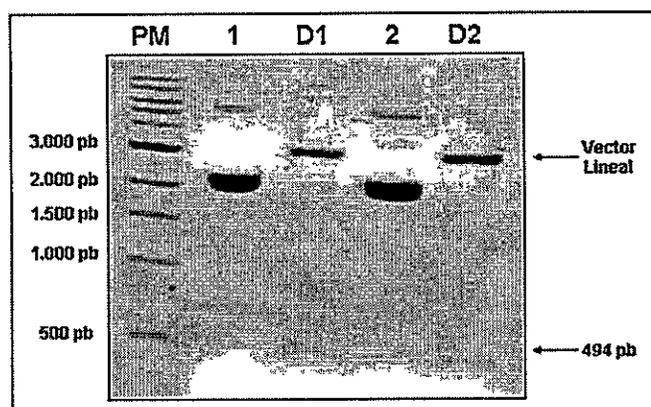
El DNA plasmidial de los clones 1 y 2 fue extraído según lo descrito en 2.2.8. Estos DNAs se analizaron mediante PCR (2.2.12.2.) con los partidores LcybEco (Tabla 1) obteniendo la amplificación del fragmento de 494 pb en los clones pGEM-T/lcyb 1 y pGEM-T/lcyb 2 (Figura 5). Esto indica que los clones pGEM-T/lcyb 1 y pGEM-T/lcyb 2 tienen clonado el fragmento de 494 pb de lcyb en el vector pGEM-T.



**Figura 5. PCR de DNAs plasmidial de los clones pGEM-T/lcyb 1 y 2.**

Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados a partir de DNA plasmidial de clones pGEM-T/lcyb 1 (1) y pGEM-T/lcyb 2 (2). Ambos clones amplifican el fragmento esperado de 494 pb de lcyb de *D. carota*. C-: Reacción de PCR sin templado. PM: Marcador de peso molecular de 100 pb.

Posteriormente, se purificó el DNA plasmidial de estos clones mediante la utilización de un kit comercial (2.2.9) para verificar la presencia del fragmento clonado por digestión con la enzima *EcoRI*. Además, este procedimiento nos permite determinar que en el procedimiento de clonación no se han perdido los sitios de restricción *EcoRI* necesarios para continuar con la clonación del fragmento de 494 pb en los vectores PUCpSS y pBIN19 para obtener los constructos para el silenciamiento post-transcripcional de todos los genes de *lcyb*. Luego de la digestión, ambos vectores liberan el fragmento de 494 pb de *lcyb* de *D. carota*, por lo tanto ambos clones poseen el fragmento de 494 pb clonado en el vector pGEM-T (Figura 6).



**Figura 6. Digestión enzimática con *EcoRI* de los clones pGEM-T/*lcyb* 1 y 2.**

Electroforesis en gel de agarosa al 1% del DNA plasmidial de los clones pGEM-T/*lcyb* 1 y 2 digeridos con *EcoRI*. Carriles. 1 y 2: plásmidos de clones pGEM-T/*lcyb* 1 y 2 sin digerir, respectivamente. Carriles D1 y D2: Plásmidos de clones pGEM-T/*lcyb* 1 y 2 digeridos con *EcoRI*, respectivamente. La digestión de ambos plásmidos libera el fragmento de 494 pb del gen *lcyβ* clonado en el vector pGEM-T easy. PM: Marcador de peso molecular de 1 Kb.

El DNA plasmidial purificado por kit de los clones pGEM-T/*lcyb* 1 y pGEM-T/*lcyb* 2 fue secuenciado demostrando la presencia del fragmento *lcyb*. El fragmento clonado presenta una identidad nucleotídica de 96% respecto al cDNA del gen licopeno β ciclasa DQ192190 de *D. carota* de la subespecie *sativus* (Figura 7). Esta diferencia en la identidad nucleotídica se debe a que en esta tesis se utilizó la variedad Nantes para la obtención del fragmento de 494 pb de *lcyb*. Sin embargo, esta diferencia no afectará el SGPT de todos los genes de *lcyb* ya que la

región amplificada es 100% idéntica a los genes de lcyβ de la variedad Nantes y además se ha descrito que se obtiene un SGPT eficiente utilizando fragmentos con identidad nucleotídica igual o superior al 88% (Burton y cols., 2000, Ingelbrecht y cols., 1999; Mueller y cols, 1995; Shweizer y cols., 2000). Por lo tanto, se puede utilizar cualquiera de estos dos clones para continuar con la síntesis de los vectores para SGTP de todos los genes lcyβ en *D. carota* variedad Nantes..

```

gb|DQ192190.1| Daucus carota subsp. sativus putative lycopene beta cyclase (LCYB)
mRNA, complete cds
Length=2022

Score = 678 bits (367), Expect = 0.0
Identities = 393/406 (96%), Gaps = 0/406 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 13  GTAGGGATTTACTGTTTCTTTCTTTCAATTCTGTATTGCCATTAAGATGGGAATCTCTC 72
          |||
Sbjct 1273 GTAGGGATTTACTGTTTCTTTCTTTCAATTCTGTATTGCCATTAAGATGGGAATCTCTC 1214

Query 73  CAATCCATGAAAATCATCTTATTTACATCAAAGGATGTTCTTCTACTTCTGCCACTATT 132
          ||
Sbjct 1213 CAGTCCATGAAAATCATCTTATTTACATCAAAGGATGTTCTTCTACTTCTGCCACTATT 1154

Query 133 CCATAAGCTACTTGGTATCCTGGATTATATGGCTTGTGCATATGAACGAGACATCTTGAA 192
          |||
Sbjct 1153 CCATAAGCTACTTGGTATCCTGGATTATATGGCTTGTGCATATGAACGAGACATCTTGAA 1094

Query 193  AAACCCAGTTGCATCAAGAACTACAGCAGCTTGAATGGTCACACCATCATTGCATATCAAT 252
          |||
Sbjct 1093 AAACCCAGTTGCATCAAGAACTACAGCAGCTTGAATGGTCACACCATCATTGCATATCAAT 1034

Query 253  AAAGATTGGCTTCCTCGTGTACAACCTTTTACAACCTTAGCCTGATGAAATTTAACTCCA 312
          ||
Sbjct 1033 AGGGATTAGCTTCCTCGTGTACAACCTTTTACAACCTTAGCCTGATGAAATTTAACTCCA 974

Query 313  TTGGATATGCACCTTCTGCATCATTTTTGATTTAAGCTGCTTCCCTGTTAACCTTCCGTAC 372
          ||
Sbjct 973  TTTGATATGCACCTTCTGCATCATTTTTGATTTAAGCTGCTTCCCTGTTAACCTTCCATAC 914

Query 373  GETCTTCCGAGCTCTTTGGTTGTCTGGTCATCAATGTAACAATTG 418
          |||
Sbjct 913  GETCTTCCGAGCTCTTTGGTTGTCTGGTCATCAATGTAACAATTG 868

```

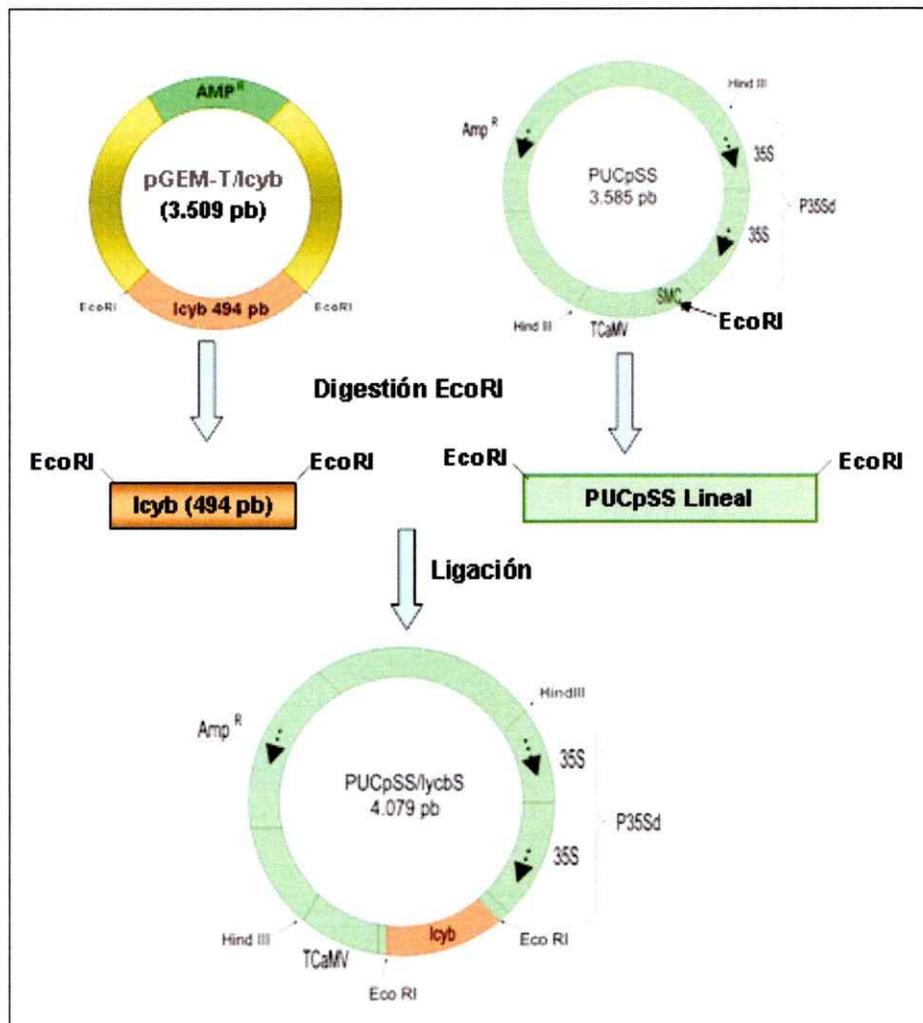
**Figura 7. Análisis de la secuencia del vector pGEM-T/lcyb 2.**

Se realizó un alineamiento (BLAST) de la secuencia obtenida de la secuenciación del DNA plasmidial del clon pGEM-T/lcyb2 utilizando un partidor específico para el promotor SP6 que se encuentra en el vector pGEM-T río arriba del sitio de clonación. Query: secuencia del clon pGEM-T/lcyb 2. Sbjct: secuencia del cDNA completo de lcyβ DQ192190 de *D. carota* sbsp sativus.

### 3.3. Construcción del vector binario para silenciar post-transcripcionalmente los genes de *Icyb* en *Daucus carota*.

#### 3.3.1. Construcción del vector PUCpSS/*Icyb*.

Para la construcción del vector para el silenciamiento de los genes *Icyb*, el fragmento de 494 pb clonado en el vector pGEM-T easy (3.2.) fue clonado en el vector PUCpSS para la obtención del constructo de expresión (Figura 8). Este constructo de expresión consta del promotor doble 35S del virus del mosaico de la coliflor, el fragmento de 494 pb en sentido o antisentido y el terminador Nos del gen de nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*.



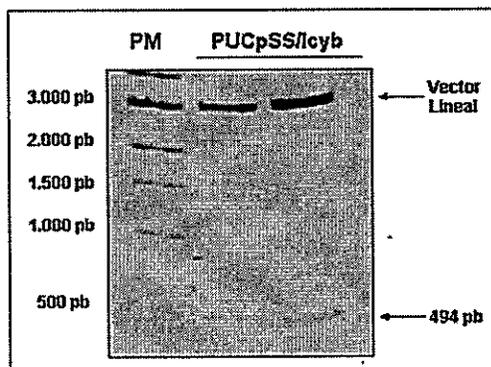
**Figura 8. Esquema de clonamiento del fragmento *Icyb* en el vector PUCpSS.**

El fragmento de 494 pb de *Icyb* de *D. carota* clonado en pGEM-T fue digerido con *EcoRI* al igual que el vector de destino y posteriormente ligados, obteniendo el vector PUCpSS/*Icyb*.

El vector pGEM-T/lcyb2 fue digerido con *EcoRI*, según lo descrito en 2.2.13., liberándose un fragmento de 494 pb de lcyb de *D. carota* que fue purificado del gel de agarosa. Por otra parte, el vector PUCpSS (4.079 pb) que confiere resistencia al antibiótico ampicilina y que posee al promotor doble 35SCaMV (35Sd, 692 pb) del virus del mosaico de la coliflor y el terminador 35SCaMV (TCaMV, 210 pb) también del virus del mosaico de la coliflor flanqueando al sitio de múltiple clonamiento (SMC), como se muestra en la Figura 8. En el SMC está presente el sitio de restricción *EcoRI* que fue elegido para clonar el inserto. Posteriormente, fue defosforilado con la enzima CIAP para evitar la recircularización y purificado de gel de agarosa (2.2.13).

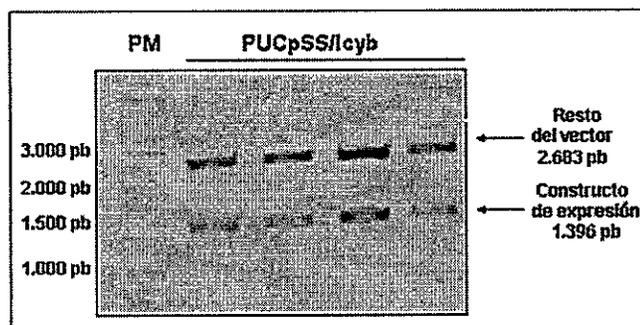
Posteriormente, el fragmento de 494 pb de lcyb fue ligado al vector PUCpSS en una proporción de inserto y vector de 30:1. De esta forma se obtuvo el vector PUCpSS/lcyb de 4.079 pb que tiene el constructo de 1.396 pb compuesto por el promotor doble 35SCaMV, el fragmento lcyb (494 pb) y el terminador CaMV (35Sd/lcyb/TCaMV). Células DH5 $\alpha$  fueron transformadas con el vector PUCpSS/lcyb. Se analizaron 20 clones mediante análisis rápido de colonias según lo descrito en (2.2.12.1.) dando positivos 13 de estos clones. Los 13 clones que dieron positivos se analizaron por PCR para verificar la presencia del fragmento lcyb clonado. En todos ellos se obtuvo el amplificado de 494 pb correspondiente al fragmento lcyb (dato no mostrado). Luego se hizo un análisis de restricción a los vectores de los clones con la enzima *EcoRI* (Figura 9) para verificar que los vectores tenían insertado el fragmento lcyb.

Además, se digirió el DNA plasmidial de los clones PUCpSS/lcyb analizados con la enzima de restricción *HindIII*, observando que los vectores liberaban el constructo de expresión 35Sd/lcyb/TCaMV de 1.396 pb (Figura 10). Los análisis realizados permitieron concluir que el fragmento de lcyb fue clonado en el vector PUCpSS ya que los 13 clones liberaron el fragmento lcyb en la digestión con *EcoRI* y el constructo de expresión de 1.396 pb en la digestión con *HindIII*.



**Figura 9. Digestión de los vectores PUCpSS/lcyb con *EcoRI*.**

Electroforesis del DNA plasmidial de 2 clones PUCpSS/lcyb digeridos con *EcoRI* en gel de agarosa al 1%. En ambos se libera la banda de 494 pb del fragmento de lcyb de *D. carota* y una banda de mayor tamaño correspondiente al vector PUCpSS lineal. PM: Marcador de peso molecular.

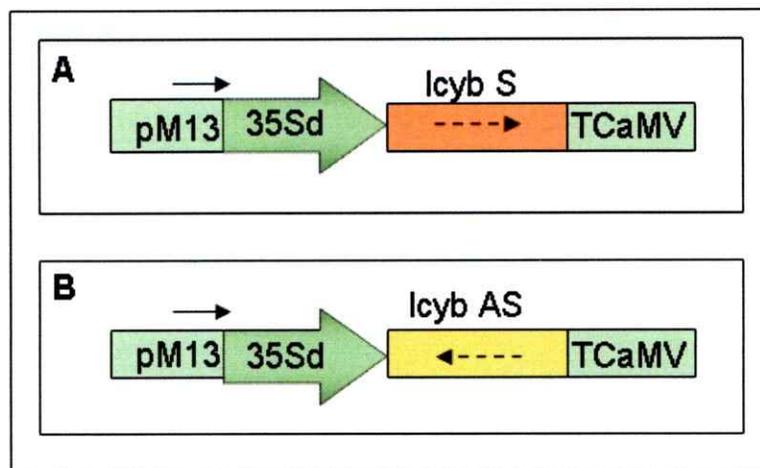


**Figura 10. Digestión de los vectores PUCpSS/lcyb con *HindIII*.**

Electroforesis del DNA plasmidial de 4 clones PUCpSS/lcyb digeridos con *HindIII* en gel de agarosa al 1%. La banda de 1.396 pb corresponde al constructo que posee el inserto. La banda superior corresponde al resto del vector (2.683 pb). PM: Marcador de peso molecular de 1 kb.

El fragmento lcyb se puede integrar al sitio de múltiple clonamiento del vector pUCpSS en orientación sentido o antisentido. La orientación que adopte respecto al promotor 35Sd determina si el fragmento clonado se transcribirá en sentido o antisentido. Para determinar la orientación del inserto los clones PUCpSS/lcyb fueron secuenciados utilizando un partidor específico para el promotor pM13 que se encuentra río arriba del promotor 35Sd (Figura 11).

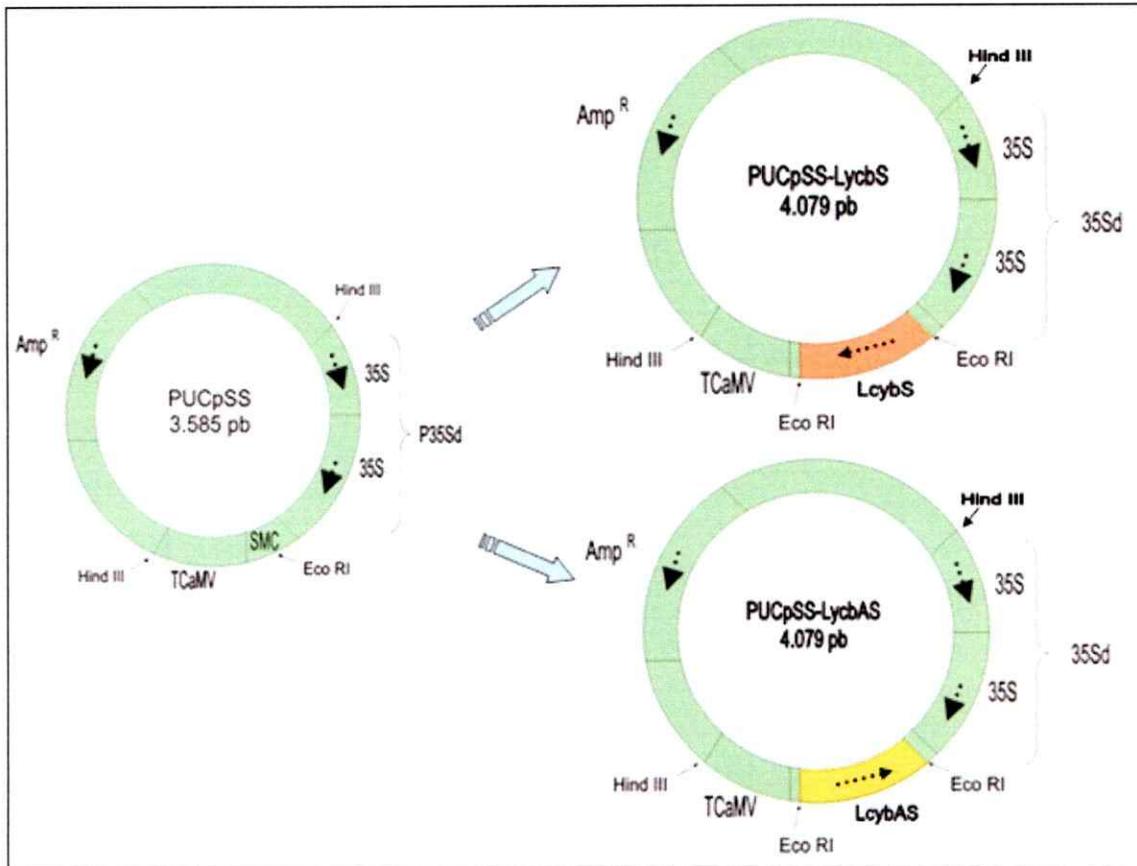
Como resultado de los análisis de la secuencia se determinó que se obtuvieron 7 clones en orientación sentido y 6 clones en orientación antisentido respecto al promotor 35Sd.



**Figura 11. Esquema del constructo de expresión 35Sd/lcyb/TCaMV.**

Constructo de expresión del fragmento lcyb en orientación sentido (A) y antisentido (B). La flecha negra indica el partidor específico del promotor pM13. La flecha discontinua indica la orientación del fragmento clonado respecto al promotor 35Sd.

Se seleccionó un clon transformado con el vector PUCpSS con el fragmento en sentido y otro en antisentido, los que han sido llamados PUCpSS/lcybS y PUCpSS/lcybAS, respectivamente. Estos vectores fueron digeridos con *HindIII* para purificar los constructos en sentido (35Sd/lcybS/TCaMV) y en antisentido (35Sd/lcybAS/TCaMV) (Figura 12) para clonarlos en el vector binario pBIN19.



**Figura 12. Vectores PUCpSS, PUCpSS/LcybS y PUCpSS/LcybAS.**

Esquema del vector PUCpSS (3.585 pb). Amp<sup>R</sup>, resistencia a Ampicilina. SMC, sitio de múltiple clonamiento. 35Sd, promotor doble 35SCaMV de 692 pb, TCaMV: terminador de 210 pb. PUCpSS/LcybS y PUCpSS/LcybAS vectores recombinantes que tienen el transgen en sentido y antisentido, respectivamente.

### 3.3.2. Construcción de los vectores binarios pBIN19/L-S, pBIN19/L-AS y pBIN19/L-ASD para SGPT de los genes que codifican para LCYB de *D. carota*.

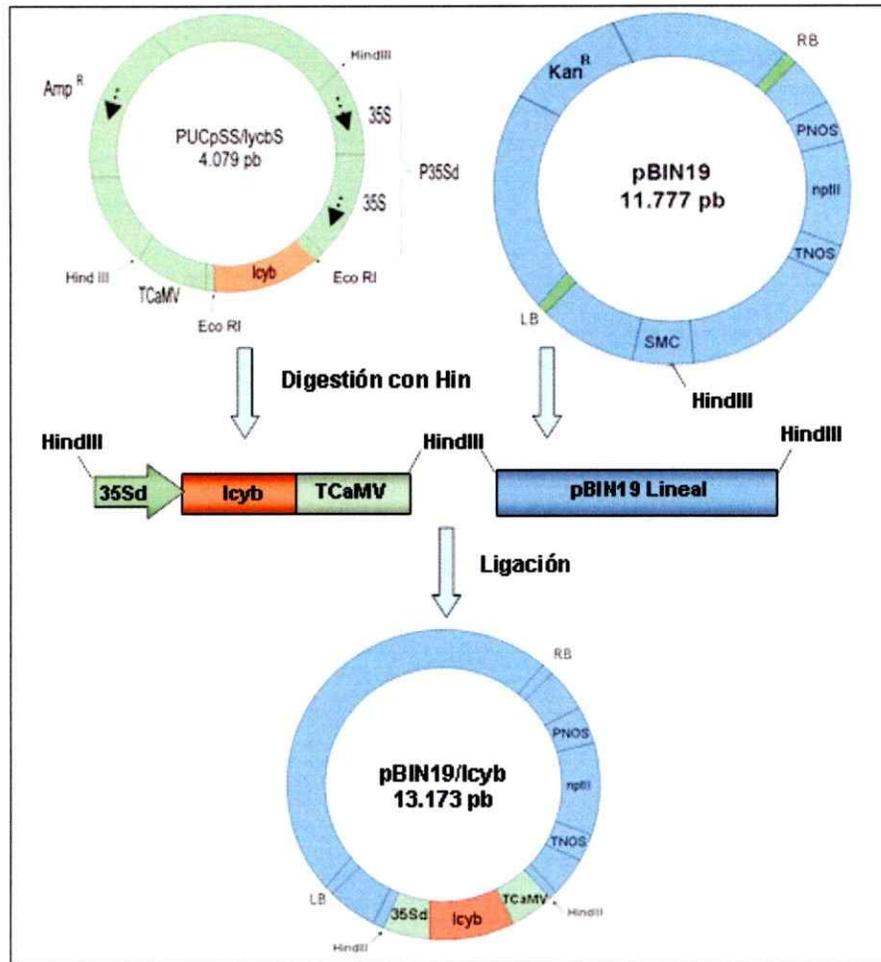
Los vectores binarios poseen el transgen que se desea incorporar en la planta delimitado por los bordes derecho (LB) e izquierdo (LR). La bacteria *A. tumefaciens* se encarga de reconocer estos bordes e insertar al azar esta región de DNA en el genoma de la planta..

El constructo 35Sd/lcybS/TCaMV y 35Sd/lcybAS/TCaMV fueron clonados en el vector binario pBIN19 (Figura 13) que será utilizado para transformar y expresar el fragmento de

494 pb de *lcyb* en plantas. Los vectores PUCpSS/*lcybS* y PUCpSS/*lcybAS* fueron digeridos con *HindIII* para liberar el constructo 35Sd/*lcybS*/TCaMV y 35Sd/*lcybAS*/TCaMV. Posteriormente, fueron purificados de gel y clonados por separado en el sitio restricción *HindIII* del sitio de múltiple clonamiento del vector binario pBIN19 (11.777 pb, Figura 9), tal como fue descrito en 2.2.14. Para verificar la presencia de plásmidos recombinantes se determinó la presencia del fragmento de 494 pb de *lcyb* de *D. carota* mediante un análisis de PCR a los DNAs plasmidiales de 7 clones pBIN19/L-S (poseen el constructo pBIN19/35Sd/*lcybS*/TCaMV) y a 13 clones pBIN19/L-AS (poseen el constructo pBIN19/35Sd/*lcybAS*/TCaMV) (Figura 13).

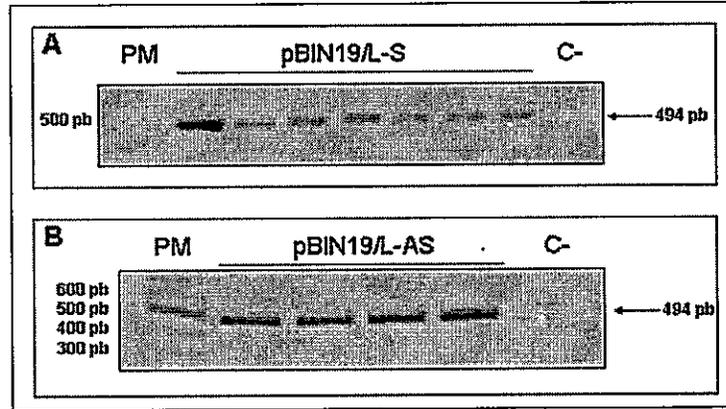
Los 7 clones transformados con pBIN19/L-S tenían el fragmento *lcyb* y en consecuencia, el constructo 35Sd/*lcybS*/TCaMV (Figura 14A). Por otra parte, de los 13 clones transformados con pBIN19/L-AS, 10 clones amplificaron el fragmento *lcyb*, por lo tanto, tienen el constructo 35Sd/*lcybAS*/TCaMV (Figura 14B).

Se seleccionó un clon que posee el vector pBIN19/L-S y dos clones con el vector pBIN19/L-AS para digerirlos con *HindIII*. De esta digestión se obtuvo que el clon con el vector pBIN19/L-S libera un fragmento de 1.396 pb que corresponde al constructo 35Sd/*lcybS*/TCaMV clonado (Figura 15). Por otra parte, uno de los clones (AS) con el vector pBIN19/L-AS libera el constructo 35Sd/*lcybAS*/TCaMV de 1.396 pb, mientras que el otro clon libera un fragmento de este tamaño y otro de aproximadamente 2.800 pb que corresponde posiblemente a una digestión parcial. Esto nos indica que en el vector de este último clon se insertaron dos constructos 35Sd/*lcybAS*/TCaMV. A este vector lo llamaremos pBIN19/L-ASD. La presencia e identidad de los constructos fue verificada por secuenciación.



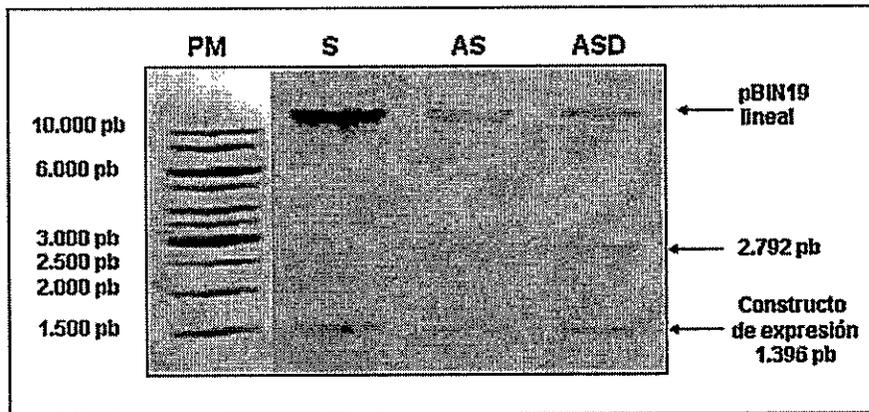
**Figura 13. Esquema del constructo 35d/lcyb/TCaMV en el vector binario pBIN19.**

El constructo de expresión se obtuvo mediante digestión con *HindIII* del vector PUCpSS/lcyb para luego ser ligado en el sitio de múltiple clonamiento vector binario pBIN19 generando el vector binario pBIN19/lcyb.



**Figura 14. PCR de clones transformados con pBIN19/L-S o pBIN19/L-AS.**

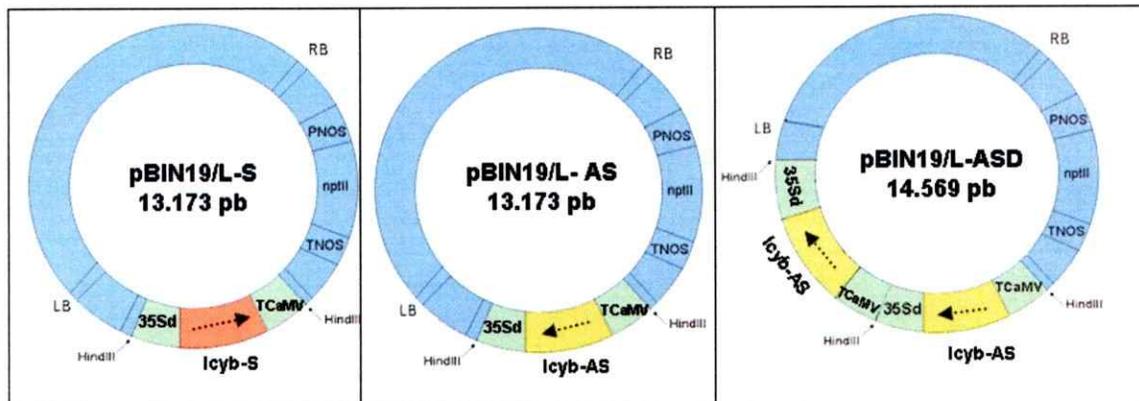
Electroforesis de la amplificación por PCR del fragmento 494 pb de *lcyb* en gel de agarosa al 1%. Se utilizó como templado el DNA plasmidial de 7 clones **pBIN19/L-S** (A) y 4 clones **pBIN19/L-AS** (B). La flecha indica el fragmento de 494 pb de *lcyb* de *D. carota*. C-: Reacción de PCR sin templado. PM: Marcador de peso molecular.



**Figura 15. Digestión de los vectores pBIN19/L-S, pBIN19/L-AS y pBIN19/L-ASD con la enzima de restricción *HindIII*.**

Electroforesis de DNA plasmidial de clones **pBIN19/L-S**, **pBIN19/L-AS** y **pBIN19/L-ASD** digeridos con *HindIII*. S: **pBIN19/L-S**. AS: **pBIN19/L-AS**. ASD: **pBIN19/L-ASD**. Banda 11.777 pb, vector pBIN19 lineal (Sin inserto). PM: Marcador de peso molecular de 1 kb.

En resumen, se obtuvieron tres vectores que serán utilizados para el silenciamiento génico post-transcripcional (SGPT) de todos los genes *lcyb* que codifican para la actividad LCYB: **pBIN19/L-S** que posee el constructo P35Sd/*lcybS*/TCaMV, **pBIN19/L-AS** que tiene el constructo P35Sd/*lcybAS*/TCaMV y por último un vector con 2 constructos 35Sd/*lcybAS*/TCaMV llamado **pBIN19/L-ASD** (Figura 16).



**Figura 16. Esquema vectores binario pBIN19/L-S, pBIN19/L-AS, pBIN19/L-ASD.**

**pBIN19/L-S**, que tiene el constructo 35Sd/*lcybS*/TCaMV, **pBIN19/L-AS** que posee constructo 35Sd/*lcybAS*/TCaMV y **pBIN19/L-ASD** con dos construcciones en antisentido 35Sd/*lcybAS*/TCaMV. 35Sd, promotor doble 35SCaMV (692 pb). TCaMV, terminador CaMV (210 pb).

### 3.4 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con los vectores de SGPT de *lcyb* totales.

Se transformaron células competentes de *A. tumefaciens* cepa GV3101 con los vectores para SGPT de todos los genes *lcyb*: **pBIN19/L-S**, **pBIN19/L-AS** y **pBIN19/L-ASD** por separado, de acuerdo a los descrito en 2.2.4. Se eligieron algunos de los clones obtenidos para analizarlos mediante PCR de colonia (Figura 17). Para cada transformación con los vectores de SGTP se obtuvieron clones que amplificaron el fragmento de 494 pb de *lcyb*, por lo tanto estos clones tienen el vector para SGPT con el cual fueron transformados. Este resultado indica que ya se cuenta con los clones de *A. tumefaciens* transformados con los vectores **pBIN19/L-S**,

pBIN19/L-AS y pBIN19/L-ASD aptos para transformar *N. tabacum* y *D. carota*, donde se evaluará el silenciamiento post-transcripcional de los genes que codifiquen para LCYB.

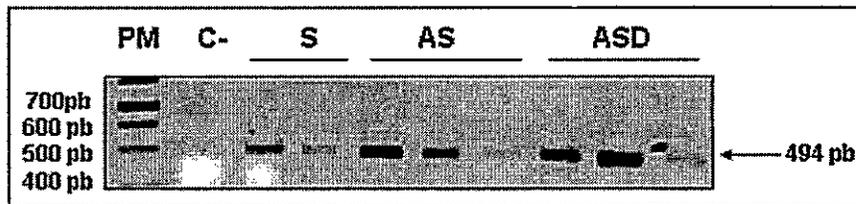


Figura 17. PCR de colonia a partir de clones de *A. tumefaciens* transformados con los vectores para SGPT pBIN19/L-S, pBIN19/L-AS y pBIN19/L-ASD.

Electroforesis de la amplificación por PCR del fragmento 494 pb de *lcyb* en gel de agarosa al 1%. Se utilizó como templado colonias de clones pBIN19/L-S (S), clones pBIN19/L-AS (AS) y pBIN19/L-ASD (ASD) de *A. tumefaciens*. C-: Reacción de PCR sin templado. PM: Marcador de peso molecular.

#### 4.- DISCUSIÓN

La construcción de los vectores **pBIN19/L-S**, **pBIN19/L-AS** y **pBIN19/L-ASD** obtenidos en este seminario de título se enmarca dentro del estudio funcional del gen DQ192190 que codifica para la enzima licopeno  $\beta$  ciclasa de *D. carota* (zanahoria). Este trabajo es parte de una nueva línea de investigación que comprende el estudio de la regulación de los genes carotenogénicos de *D. carota* en distintos estados del desarrollo y en presencia o ausencia de luz. *D. carota* es un organismo que presenta una alta producción de carotenoides en la raíz modificada, en especial de  $\beta$ -caroteno. Los carotenoides son sintetizados no sólo en la raíz modificada de zanahoria, sino también en los órganos fotosintéticos de ésta. De acuerdo a los antecedentes reportados sobre el proceso de de-etiolación de *A. thaliana*, los carotenoides requieren de luz para ser sintetizados en las hojas (Welsch y cols., 2003) y en frutos (Fraser y cols., 1994; von Lintig y cols., 1997). Sin embargo, la síntesis de carotenoides en la raíz modificada de esta planta ocurre en oscuridad. Siendo *D. carota* un modelo de estudio novedoso, sería interesante dilucidar la manera por la cual se regula la expresión de los genes carotenogénicos en los distintos órganos de *D. carota* y el efecto que podría tener la luz en este proceso. Por ello, deseamos determinar si son los mismos genes carotenogénicos que cumplen la función en ambos órganos o si la función de ellos es específica para uno de los órganos (raíz u órgano fotosintético), como ha sido reportado en otros modelos. Para comenzar esta investigación hemos decidido utilizar la técnica de silenciamiento génico post-transcripcional (SGPT) para determinar el rol funcional del gen DQ192190 que codifica para licopeno  $\beta$  ciclasa, enzima que está directamente relacionada con la síntesis de  $\beta$ -caroteno, el principal carotenoide producido en la raíz de zanahoria. Al comenzar este seminario de título contábamos con la secuencia parcial de lcyb (AF208531, 497 pb) proveniente de raíz de *D. carota* y dos secuencias parciales obtenidas de frutos de *D. carota*, AM181169 (345 pb), AM181168 (319 pb). En enero de este año se publicó la secuencia completa del cDNA de lcyb obtenida de raíz de *D. carota* subespecie sativus con el número de acceso DQ192190 la cual tiene un 98%, 93%

y 95% de identidad con las secuencias descritas previamente.. Es posible que estas secuencias parciales formen parte de otro gen que codifique para LCYB o, sean parte de la secuencia de un único gen lcyb presente en *D. carota*, el cual podría ser el gen DQ192190. Debido a que la información entregada por la base de datos no indicaba la fuente precisa de la subespecie de zanahoria de la cual fueron identificadas las secuencias parciales, podríamos sugerir que la diferencia en identidad de las secuencias parciales respecto a DQ192190 se debe a que provienen de una diferente fuente genética. Para dilucidar si en *D. carota* existe más de un gen que codifica para LCYB, nos propusimos silenciar todos los genes que codifican para LCYB mediante los vectores generados en este seminario de título y comparar los resultados respecto al fenotipo y resultados generados silenciando específicamente el gen lcyb DQ192190 utilizando la región 5' o 3' NTR.,

El SGPT es un proceso utilizado como herramienta para el estudio funcional de genes endógenos a través de la pérdida de función del gen blanco. Por lo tanto, se puede obtener la información sobre el rol biológico del gen en estudio basándose en los resultados que se observan al disminuir la expresión del gen de interés (knock down). El SGPT es un mecanismo molecular que consiste en la degradación específica de una población de RNAs homólogos. Esto fue observado por primera vez al introducir una copia extra del gen endógeno de chalcona sintasa (transgen) bajo un promotor fuerte (35SCaMV) en el genoma de petunias (Napoli y cols., 1990). El resultado obtenido fue que los RNAs del transgen y el endógeno fueron degradados. A este proceso se le llamó co-supresión (Vaucheret y cols., 2001). La co-supresión es uno de los mecanismos que gatillan eficientemente el SGPT. Se basa en la presencia de una copia única del transgen en sentido y con una alta tasa de transcripción. Existe evidencia que la eficiencia de la inducción del silenciamiento depende de la cantidad de RNA producido que sobrepasa un nivel umbral activando la acción de una RNA polimerasa dependiente de RNA (RpRd) que sintetiza la hebra complementaria al mRNA endógeno, lo que permite la formación de un RNA de doble hebra (dsRNA) (van Blockland y cols., 1994; Tang y cols., 2003). Es así como transgenes con promotores fuertes gatillan con una mayor eficiencia el SGPT (Que et al,

1997) y aún más si la planta es homocigota para el transgen (de Carvalho y cols., 1992). También es posible silenciar post-transcripcionalmente un gen si el transcrito producido es incorrectamente procesado generando un RNA aberrante (abRNA) (Baulcombe, 1996). Otro tipo de mecanismo de SGPT se fundamenta en la defensa de plantas frente a virus. Se ha observado que durante la infección de plantas con virus RNA (+) de hebra simple (ssRNA) se genera una hebra complementaria a su RNA la cual forma un dsRNA intermediario con el RNA (+) molde durante la replicación, que provoca la activación del silenciamiento del RNA viral (Lu y cols., 2003). Utilizando los mecanismos naturales de defensa de las plantas frente a virus, se han desarrollado diversas estrategias para estudiar *in vivo* el rol que cumplen genes endógenos en plantas modelo. Una de estas estrategias consiste en transformar plantas con un constructo que posee el transgen en antisentido respecto al promotor que lo controla, el cual al transcribirse generará un mRNA complementario al gen blanco del silenciamiento, con el cual hibridará formando el dsRNA que inicia el SGPT. Otra estrategia se basa en la construcción de un cassette de 2 copias del transgen puestas como invertidos repetidos separados por un intrón y controladas bajo un sólo promotor. Se propone que la transcripción de estos repetidos invertidos genera un RNA de doble hebra en horquilla que gatilla eficientemente el SGPT, aún con muy bajas cantidades de RNA de doble hebra (Hamilton y cols., 1998).

El silenciamiento génico es gatillado de manera localizada y estocástica, propagándose sistémicamente mediante señales que son transmitidas a toda la planta. Los dsRNAs intermediarios son clivados por la acción de una RNasa de tipo III llamada Dicer generando pequeñas moléculas de 21-23 nucleótidos de dsRNA que poseen 2 nucleótidos sin aparear en los extremos 3' de cada hebra, llamado RNA interferente (siRNA) corto y otras de 24-26 nucleótidos con las mismas características, llamado siRNA largo (Susi y cols., 2004; Tang y cols., 2003). El siRNA corto participa en el SGPT local, mientras que el siRNA largo está involucrado en el SGPT sistémico. El siRNA largo es el principal candidato para molécula señal que transmite SGPT a toda la planta a través de los plasmodesmos (vía simplástica) o a través

de sistema vascular de la planta, imitando el movimiento de partículas virales (Hamilton y cols., 2002; Voinnet y cols., 1998).

Los vectores binarios construidos **pBIN19/L-S**, **pBIN19/L-AS** y **pBIN19/L-ASD** serán utilizados para transformar *D. carota* y silenciar post-transcripcionalmente los genes que codifican para LCYB. La transformación se realizará mediante la infección de *D. carota* con *A. tumefaciens* GV3101 transformada con cada uno de los vectores binarios construidos. La inserción del constructo de interés en el genoma de la planta se realiza al azar mediante recombinación "ilegítima" (Gheysen y cols., 1991). El DNA que se transfiere está determinado y delimitado por la presencia de los bordes derecho e izquierdo (RB y LB) del vector binario. Estos bordes en el vector binario pBIN19 utilizado en este trabajo, están flanqueando el constructo clonado (35Sd/lcybS/TCaMV, 35Sd/lcybAS/TCaMV o 35Sd/lcybAS/TCaMV//35Sd/lcybAS/TCaMV) y el gen de resistencia a kanamicina (nptII) que esta bajo el control del promotor NOS y terminador NOS (ambos provenientes del gen de la nopalina sintasa). Nuestros constructos tienen al transgen (fragmento de 494 pb) bajo un promotor constitutivo fuerte como es el promotor 35SCaMV del virus del mosaico de la coliflor (35S) en duplicado (35Sd). Este promotor consta de 692 pb que corresponden a un fragmento de 418 pb del promotor 35SCaMV al cual se le ha fusionado al extremo 5' un fragmento de 274 pb que corresponde a la repetición de la región 5' del mismo promotor. Esta característica permite al 35Sd ser un promotor más fuerte que el promotor 35SCaMV, siendo este último es entre 10 y 40 veces mas fuerte que el promotor de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (Rogers y cols., 1985). Por característica el transgen tendrá una alta tasa de transcripción, lo que aumentará las probabilidades de generar las líneas transformantes que presenten SGPT específico de los genes lcyb. Mediante las secuenciaciones realizadas no se pudo determinar la disposición de los dos constructos 35Sd/lcybAS/TCaMV en el vector **pBIN19/L-ASD**. Sin embargo, la orientación de los constructos en el vector **pBIN19/L-ASD** no modifica la orientación en que el fragmento de 494 pb será transcrito, pues la direccionalidad de la

transcripción está dada por su disposición respecto al promotor 35SCaMV y ésta fue determinada previamente por la secuenciación de los vectores PUCpSS/lcyb.

El silenciamiento que se generará tiene como blanco todos los genes que codifiquen para LCYB en este organismo. Esto se basa en el hecho que el transgen (494 pb) proviene de la región codificante del gen de lcyb DQ192190 y que, además, posee una alta homología con las otras 3 secuencias parciales para lcyb: AM181168 (98% de identidad nucleotídica), AM181169 (94% identidad nucleotídica) y AF208531 (95% identidad nucleotídica). Esta alta identidad nucleotídica que presenta con los genes lcyb de *D. carota* descritos y la alta identidad nucleotídica que presenta con otros genes de LCYB de otras especies vegetales (entre 79 – 97 % de identidad) nos hace suponer que el fragmento clonado tendrá una alta identidad nucleotídica con otros posibles genes que codifiquen para LCYB en *D. carota*. Por lo tanto este fragmento sería suficiente para silenciar post-transcripcionalmente los genes de lcyb en zanahoria. Se ha descrito que secuencias de transgenes con una identidad entre 88-100% al gen endógeno son capaces de iniciar SGPT, mientras que secuencias con 81% de identidad o menos no gatillan el SGPT (Burton y cols., 2000, Ingelbrecht y cols., 1999; Mueller y cols, 1995; Schweizer y cols., 2000). Además, el fragmento de 494 pb será suficiente para iniciar el SGPT, ya que ha sido descrito que 59 pb son suficientes para iniciar el SGPT. Sin embargo, transgenes de 500 pb presentan un SGPT marcadamente más fuerte y eficientes que transgenes de 149 pb y aún mas que transgenes de 59 pb (Thomas y cols., 2001). De esta manera al transformar *D. carota* con nuestros vectores se silenciaría la los genes lcyb en toda la planta. Por lo tanto, la síntesis de  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno y el resto de los carotenoides como la zeaxantina y la violaxantina (Figura 1), se verían disminuídas en toda la planta, dependiendo del porcentaje de silenciamiento que presnete el gen lcyb en cada línea transgénica. En líneas con una alta tasa de SGPT se espera observar la acumulación de licopeno en hojas y en la raíz modificada de zanahoria, mientras que plantas en las cuales existe una expresión basal de lcyb esperamos observar mayor acumulación de  $\alpha$ -caroteno y lutéina respecto de  $\beta$ -caroteno (Figura 1). La eficiencia del silenciamiento de los genes lcyb será observada visualmente por la

aparición de tonalidad rojiza en la raíz modificada, color característico del carotenoide licopeno o amarilla debido a la acumulación de  $\alpha$ -caroteno y luteína. Además, las líneas transgénicas serán analizadas molecularmente mediante estudios de expresión de los genes carotenogénicos. El SGPT de los genes que codifican para LCYB afectará directamente al ciclo de las xantofilas que participa en la fotoprotección de las células vegetales mediante un proceso de disipación térmica de energía por acción de la enzima violaxantina de-epoxidasa (VDE) (Figura 1) (Revisado en Niyogi, 1999). Este proceso permite la fuga del exceso de energía lumínica absorbida disminuyendo la producción de especies reactivas del oxígeno que provocan daño oxidativo en el aparato fotosintético (Asada, 1994; Foyer y Harbinson, 1994.). Esperamos que la expresión basal de los genes que se encuentran silenciados no afecte la biosíntesis de estas xantofilas y evitar así la acumulación de especies reactivas de oxígeno que causarían un grave daño foto-oxidativo a los fotosistemas. Otra consecuencia de este silenciamiento es que se podría disminuir la síntesis del ácido abscísico (ABA). El ABA participa en muchos procesos de la planta como el desarrollo de semillas, en la regulación de apertura estomática y en la respuesta a estrés abiótico y biótico (Mauch-Mani, 2005). Es por ello que seleccionaremos líneas transgénicas que presenten un porcentaje de SGPT de los genes de lcyb que nos permitan determinar el rol del gen DQ192190 pero que no presenten alteraciones en el desarrollo normal de las plantas.

La tasa de SGPT dependerá de la construcción utilizada para inducir el silenciamiento de lcyb. En el caso de la transformación con el vector **pBIN19/L-S** que inserta el constructo con el transgen en sentido respecto al promotor 35Sd, se podría observar SGPT si se sobrepasa el nivel umbral o generar un abRNA los que permiten que la RpRd sintetice la hebra complementaria del RNA para la formación del dsRNA necesario para la iniciación del SGPT. En el caso de la transformación con el vector **pBIN19/L-AS**, en el cual el cassette de expresión tiene al transgen en antisentido respecto al promotor 35Sd que determina su transcripción, se facilitará el encuentro de los mRNA endógeno (en sentido) y el RNA antisentido para la formación del dsRNA, sin la necesidad de la acción de la RpRd. Así el dsRNA formado podría

activar el SGPT. Por este motivo esperaríamos que las líneas de *D. carota* generadas a partir de la transformación con el vector binario **pBIN19/L-AS** muestre un mayor SGPT que las obtenidas de la transformación de plantas con el vector **pBIN19/L-S**. De manera similar el vector **pBIN19/L-ASD** que tiene dos cassettes 35Sd/**lcybAS**/TCaMV transcribiría el doble de mRNA que las líneas transgénicas obtenidas de la transformación con **pBIN19/L-AS** que solo tienen insertado una copia de 35Sd/**lcybAS**/TCaMV. Por esta razón esperamos que se genere un SGPT de los genes *lcyb* con mayor eficiencia al observado en la transformación con el vector **pBIN19/L-AS** y mayor aún a las líneas transformadas con **pBIN19/L-S**.

Existen otras estrategias para obtener SGPT en plantas. Una de ellas se basa en la inserción de dos constructos de expresión uno con el transgen en sentido y otro en antisentido. Esto fue realizado por Waterhouse (1998) quien obtuvo que el SGPT es más eficiente al transformar con un vector que posee un constructo que porta el transgen en sentido junto a otro constructo que porta el transgen en antisentido al compararlo con el SGPT producido en plantas transformadas con el constructo con el transgen en sentido o con el constructo con el transgen en antisentido por separado. Sin embargo, esperamos que la tasa de silenciamiento de las plantas transformadas con los vectores **pBIN19/L-AS** y **pBIN19/L-ASD** sea lo suficientemente eficiente como para evidenciar el efecto de SGPT de los genes de *lcyb*. Actualmente, contamos con otra estrategia más eficiente para generar vectores de SGPT. Esta se basa en la utilización del vector pHELLSGATE y el sistema de recombinación Gateway. Con este sistema se realiza una reacción de PCR para amplificar el fragmento del gen blanco a silenciar y mediante recombinación es posible obtener el vector pHELLSGATE con dos copias del fragmento del gen, una en sentido y otra en antisentido, separados por un-intrón y flanqueados por el promotor 35SCaMV y el terminador OCS (Helliwell y Waterhouse, 2003) Esta estrategia la estamos utilizando para silenciar el gen DQ192190 de *LCYB* de *D. carota*. El fragmento que se utilizará corresponde a la región 5' NTR del gen DQ192190 debido a la baja homología que presentan los genes en las regiones NTR (Elorza y cols, 2004).

Los vectores obtenidos (pBIN19/L-S, pBIN19/L-AS y pBIN19/L-ASD) inducirán el silenciamiento post-transcripcional de todos los genes *lcyb* y permitirán comparar los resultados del SGPT del gen DQ192190. Debido a que la inserción del transgen en el proceso de transformación es al azar, obtendremos distintas líneas cuyo índice de SGPT será influenciado por la tasa de transcripción dada por el contexto genético en el cual fue insertado el cassette en el genoma de la planta. Para que los resultados entre el SGPT del gen DQ192190 y el de todos los genes *lcyb* sea comparable, tomaremos líneas en las cuales el porcentaje de silenciamiento sea el mismo.

Existen varios posibles resultados que se pueden obtener a partir del SGPT de DQ192190 en *D. carota*. Uno de ellos puede ser que en las líneas transformadas el fenotipo del silenciamiento sea igual al fenotipo silvestre a pesar de que la expresión del gen DQ192190 disminuya. En este caso, es importante validar que este fenotipo se debe a que el gen DQ192190 es redundante, es decir, que su función sea suplida por otros genes *lcyb*. Este hecho sólo lo podremos asegurar si realizamos el SGPT de todos los genes endógenos *lcyb* y se observe el fenotipo de una planta que tenga silenciada a los genes que codifiquen para LCYB y por lo tanto no presente actividad LCYB en toda la planta. Otro caso que se puede obtener es que el fenotipo de la planta que tiene silenciado el gen DQ192190 sea el mismo que el fenotipo que presente la planta que tenga silenciada todos los genes *lcyb*. También podría ocurrir que el fenotipo cambie en algún órgano y, por lo tanto, el gen tendría una función órgano específico y no redundante. Este fenotipo debería ser similar al que muestra el silenciamiento de todos los genes *lcyb* en ese determinado órgano.

De acuerdo a lo descrito en la literatura el vector derivado de pHELLSGATE generaría un silenciamiento más eficiente que nuestros vectores derivados de pBIN19. En este contexto sería interesante comparar la eficiencia del SGPT de los vectores derivados del vector pBIN19 para el silenciamiento de todos los genes que codifican para LCYB generados en esta tesis y el vector que se construirá con el sistema pHELLSGATE Gateway para el SGPT específico de DQ192190. Para lograr esto se deberían analizar aproximadamente unas 20 líneas

transgénicas producidas de la transformación con cada uno de los vectores construidos en esta tesis (pBIN19/L-S, pBIN19/L-AS y pBIN19/L-ASD) y el obtenido mediante el sistema pHELLSGATE Gateway para el gen DQ192190. Se debería evaluar mediante análisis estadísticos si existen diferencias significativas en cuanto al porcentaje de silenciamiento post-transcripcional del DQ192190 entre el sistema que usa pBIN19 y el sistema pHELLSGATE.

Si los resultados de la investigación del SGPT del gen DQ192190 indican que este gen es órgano específico permitirían centrar las investigaciones en el promotor del gen de lcyb DQ192190 para comprender la regulación de la expresión de este gen. En este sentido habría que obtener dicho promotor, y analizar si en él se encuentran elementos regulatorios en cis conocidos. Además, sería interesante realizar estudios de delección del promotor de tal manera de definir regiones activadoras y represoras de la transcripción del gen en dicho órgano de *D. carota*. Si el gen es específico de órganos fotosintéticos esperaríamos encontrar en su promotor cajas asociadas a luz como Z-box, motivo G1 y G2 (Yadav, 2002; von Lintig, 1997). Si el gen es específico de raíz, debería presentar cajas regulatorias que no han sido descritas, como posibles cajas asociadas a oscuridad o la presencia de cajas asociadas al desarrollo, pues hemos observado que la síntesis de carotenoides en la raíz modificada de zanahoria está asociada su desarrollo y crecimiento. Siguiendo con este último caso, el descubrimiento de un promotor específico de raíz modificada abre un campo para el estudio y aplicación de este promotor en otros organismos. Un ejemplo de esto podría ser insertar en *D. carota* un gen de importancia comercial cuya expresión sea necesaria en la raíz modificada bajo el dominio de este promotor específico. Este promotor también podría ser utilizado para expresar genes que confieran resistencia a patógenos del género *Pythium* (como *Pythium sulcatum*, *Pythium sylvaticum*) que afectan drásticamente el cultivo de zanahoria en Chile y el mundo (Martinez y cols., 2005).

## 5.- CONCLUSIÓN

Para el silenciamiento génico post-transcripcional de los genes *Icyb* de *D. carota* se seleccionó un fragmento de 494 pb conservado (transgen) del gen de *Icyb* DQ192190 que tiene una alta identidad nucleotídica con las secuencias parciales de *Icyb* de *D. carota* y con los genes de *Icyb* de otras plantas que están anotadas en la base de datos NCBI. Este fragmento fue clonado en el vector PUCpSS para obtener los cassette de expresión 35Sd/*IcybS*/TCaMV que expresará al transgen en sentido, 35Sd/*IcybAS*/TCaMV que transcribirá el transgen en antisentido y 35Sd/*IcybASD*/TCaMV que posee dos constructos 35Sd/*IcybAS*/TCaMV. Cada uno de los cassettes fue clonado en el vector binario pBIN19 generando los vectores binarios **pBIN19/L-S**, **pBIN19/L-AS** y **pBIN19/L-ASD**, respectivamente. *A. tumefaciens* fue transformada con estos vectores. Actualmente la expresión del transgen está siendo evaluada en *Nicotiana tabacum* para transformar posteriormente, *D. carota* e inducir el silenciamiento génico post-transcripcional de la posible familia génica de *Icyb* en esta planta.

## 6.- BIBLIOGRAFÍA

- Asada K.** 1994. **Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues.** In Causes of photooxidative stresses and amelioration of defense system in plants, Ed. CH Foyer, PM Mullineaux, pp. 77- 104. Boca Raton: CRC Press.
- Bartley G, Scolnik P.** 1993. CDNA cloning expression during fruit development and genome mapping of PSY2, a second tomato gene encoding phytoene synthase. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 25718-25721.
- Bartley G, Scolnik P.** 1995. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction and human health. *Plant Cell* **7**: 1032.
- Baulcombe DC.** 1996. RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* **12**: 684-688.
- Bohne F, Linden H.** 2002. Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemica et Biophysica Acta* **1579**: 26-34.
- Buchanan BB, Balmer Y.** 2005. Redox regulation: A broadening horizon. *Annual Review Plant Biology* **56**: 187-220.
- Burton RA, Gibeaut DM, Bacic A, Findlay K, Roberts K, Hamilton A, Baulcombe DC, Fincher GB.** 2000. Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene. *Plant Cell* **12**: 691-706.
- Corona V, Aracri B, Kosturkova G, Bartley GE, Pitto L, Giorgetti L, Scolnik PA, Giuliano G.** 1996. Regulation of carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development. *The Plant Journal* **9**: 505-512.
- De Carvalho F, Gheysen G, Kushnir S, Van Montagu M, Inze D, Castresana C.** 1992. Suppression of  $\beta$ -1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants. *EMBO Journal* **11**: 2595-2602.
- Elorza A, Leon G, Gomez I, Mouras A, Holuigue L, Araya A, Jordana X.** 2004. Nuclear SDH2-1 and SDH2-2 genes, encoding the iron-sulfur subunit of mitochondrial complex II in

Arabidopsis, have distinct cell-specific expression patterns and promoter activities. *Plant Physiology* **136**: 4072-87.

**Foyer CH, Harbinson J.** 1994. Oxygen metabolism and regulation of photosynthetic electron transport. In *Causes of photooxidative stresses and amelioration of defense system in plants*, Ed. CH Foyer, PM Mullineaux. pp 1-42. Boca Raton: CRC Press.

**Fonseca MEN.** 2000. Cloning and expression of carrot (*Daucus carota* L.) cDNAs coding for enzymes of the carotenoid biosynthetic pathway in roots accumulating different types and amounts of carotenoids. PhD Tesis. University of Wisconsin, Madison, WI.

**Fraser PD, Truesdale MR, Bird CR, Schuch W, Bramley PM.** 1994. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development. *Plant Physiology* **105**: 405-413.

**Fraser PD, Bramley PM.** 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research* **43**: 228-265.

**Gheysen G, Villarroel R, Van Montagu M.** 1991. Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. *Genes Development* **5**: 287-297.

**Giuliano G, Bartley GE, Scolnik PA.** 1993. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *The Plant Cell* **5**: 379-387.

**Hamilton AJ, Brown S, Yuanhai H, Ishizuka M, Lowe A, Solis A, Grierson D.** 2002. A transgene with repeat DNA causes high frequency, post-transcriptional suppression of ACC-oxidase gene expression in tomato. *Plant Journal* **15**: 737-746.

**Helliwell C, Waterhouse P.** 2003. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods* **30**: 289-295.

**Hirschberg J.** 2001. Carotenoids biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 210-218.

**Hugueney P, Badillo A, Chen HC, Klein A, Hirschberg J, Camara B, Kuntz M.** 1995. Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplast. *The Plant Journal* **8**: 417-424.

- Ingelbrecht IL, Irvine JE, Mirkov TE.** 1999. Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. *Plant Physiology* **119**: 1187-1198.
- Just BJ, Santos CAF, Fonseca MEN, Boitex LS, Olioza BB, Simon PW.** 2007. Carotenoids biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Theory Applied Genetic* **114**: 693-704.
- Krinsky N, Wang X-D, Tang T, Russell R.** 1994. Cleavage of  $\beta$ -carotene to retinoids. In *retinoids: basic science and clinical applications*, ed. MA Livrea, G Vidali 21-28. Base: Birkhaeuser.
- Lois L, Rodriguez C, Gallego F, Campos N, Boronat A.** 2000. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *The Plant Journal* **22**: 503-513.
- Lu R, Martin-Hernandez AM, Peart JK, Malcuit I, Baulcombe DC.** 2003. Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* **30**: 296-303.
- Martinez C, Levesque CA, Belanger RR, Tweddell RJ.** 2005. Evaluation of fungicides for the control of carrot cavity spot. *Pest Management Science* **61**: 767-771.
- Mauch-Mani B, Mauch F.** 2005. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 409-414.
- Mayne, S.** 1996.  $\beta$ -carotene, carotenoids and disease prevention in humans. *FASEB Journal* **10**: 690-701.
- Mordi RC.** 1993. Carotenoids: Functions and degradation. *Chemistry and Industry* **3**:79-83.
- Mueller E, Gilbert J, Davenport G, Brignetti G, Baulcombe DC.** 1995. Homology-dependent resistance: transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing. *Plant Journal* **7**: 1001-1013.

- Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R.A.** (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* **2**: 279-289.
- Niyogy K.** 1999. Photoprotection Revisited: Genetic and Molecular Approaches. *Annu. Rev. Plant Physiology* **50**: 333-359
- Okada K, Saito T, Nakagawa T, Kawamukai M, Kamiya Y.** 2000. Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **122**: 1045-1056.
- Pecker I, Gubbay R, Cunningham Jr FX, Hirshberg J.** 1996. Cloning and characterization of the cDNA for lycopene  $\beta$  cyclase from tomato reveal a decrease in its expression during tomato ripening. *Plant Molecular Biology* **30**: 806-819.
- Que Q, Wang HY, English JJ, Jorgensen RA.** 1997. The frequency and degree of co-suppression by sense chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature no sense codons in the transgene coding sequence. *Plant Cell* **9**: 1357-1368.
- Rogers SG, O'Connell K, Horsch RB, Fraley RT.** 1985. Investigation of factors involved in foreign protein expression in transformed plants. In Zaitlin M, Day P, Hollaender A, Eds. *Biotechnology in Plants Science*. Academic Press, Orlando, FL. Pp 219-226.
- Römer S, Fraser PD** (2005) Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. *Planta* **221**: 305-308
- Ronen G, Cohen M, Zamir D, Hirshberg J.** 1999. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of gene for lycopene epsilon cyclase is down regulated during ripening and is elevated in the mutant delta. *The Plant Journal* **17**: 341-351.
- Schofield A, Paliyath G.** 2005. Modulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit ripening through phytochrome regulation of phytoene synthase activity. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 1052-1060.

- Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JAD.** 2003. Elucidation of the Indirect Pathway of Abscisic Acid Biosynthesis by Mutants, Genes, and Enzymes. *Plant Physiology* **131**:1591-1601.
- Simkin AJ, Zhu C, Kuntz M, Sandmann G.** 2003. Light-dark regulation of carotenoid biosynthesis in pepper (*Capsicum annuum*) leaves. *Journal of Plant Physiology* **160**, 439-443.
- Snodderly, D.** 1995. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *American Journal of Clinical Nutrition*. **62**: 1448S-1461S.
- Steinbrenner J, Linden H.** 2003. Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control. *Plant Molecular Biology* **52**: 343-356.
- Steinbrenner J, Linden H.** 2001. Regulation of Two Carotenoid Biosynthesis Genes Coding for Phytoene Synthase and Carotenoid Hydroxylase during Stress-Induced Astaxanthin Formation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiology* **125**: 810-817.
- Susi P, Hohkuri M, Wahlroos T, Kilby NJ.** 2004. Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms. *Plant Molecular Biology* **54**:157-174.
- Tang G, Reinhart BJ, Bartel D, Zamore PD.** 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Development* **17**: 49-63
- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD.** 2004. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **58**: 100-110.
- Thomas C, Jones L, Baulcombe D, Maule A.** 2001. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *The Plant Journal* **25**: 417- 425
- Van Blockland R, Van der Geest N, Mol JNM, Kooter JM.** 1994. Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase RNA turnover. *Plant Journal* **6**: 861-877
- Vaucheret H, Béclin C, Fagard M.** 2001. Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science* **114**: 3083-3091

- Voinnet O, Vain P, Angell S, Baulcombe DC.** 1998. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **95**: 177-187.
- Von Lintig J, Welsch R, Bonk M, Giuliano G, Batschauer A, Kleinig H.** 1997. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *The Plant Journal* **12**: 625-634.
- Welsch R, Beyer P, Hugueney P, Kleinig H, von Lintig J.** 2000. Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta* **211**: 846-854.
- Welsch R, Medina J, Giuliano G, Beyer P, von Lintig J.** 2003. Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**: 523-534.
- Woitsch S, Römer S.** 2003. Expression of xanthophyll biosynthetic genes during light-dependent chloroplast differentiation. *Plant Physiology* **132**: 1508-1517.
- Yadav V, Kundu S, Chattopadhyay D, Negi P, Wei N, Deng XW, Chattopadhyay S.** 2002. Light regulated modulation of Z-box containing promoters by photoreceptors and downstream regulatory components, COP1 and HY5, in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **31**: 741-753.
- Zhu XF, Suzuki K, Saito T, Okada K, Yanaka K, Nakagawa T, Matsuda H, Kawamukai M.** 1997. Geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoded by the newly isolated gene GGPS6 from *Arabidopsis thaliana* is localized in mitochondria. *Plant Molecular Biology* **35**: 332-341.