



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE
PREGRADO

“Efectos de distintas condiciones de luz sobre el desarrollo de zanahoria (*Daucus carota*)”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de:

Ingeniera en Biotecnología Molecular

FABIANA ANTONIA MUNIZAGA CASTILLO

Directora del Seminario de Título:
Claudia Stange Klein

Co-Directora del Seminario de Título:
Daniela Arias González

Junio 2022
Santiago – Chile

UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la candidata:

FABIANA ANTONIA MUNIZAGA CASTILLO

“Efectos de distintas condiciones de luz sobre el desarrollo de zanahoria (*Daucus carota*)”

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

Dra. Claudia Stange Klein

Directora Seminario de Título

Dra. Daniela Arias González

Co-Directora del Seminario de Título.

COMISIÓN REVISORA Y EVALUADORA

Dra. Lorena Norambuena

Presidenta Comisión

Dr. Claudio Pastenes

Evaluador

Santiago de Chile, Julio 2022

BIOGRAFÍA



Mi nombre es Fabiana Munizaga. Nací un 21 de octubre de 1998 en Copiapó, pleno Desierto.

Por cosas de la vida, al día siguiente de haber terminado los experimentos para este seminario de título se me dio la oportunidad de empezar mi primer trabajo en un laboratorio en Copiapó. Nunca se me había pasado por la cabeza que volvería por “tanto”

tiempo. Considero que fui afortunada de poder volver a los zapatos de 5 años atrás y ver en perspectiva el trabajo y camino recorrido durante estos cinco años en la universidad.

Este seminario de título es el resultado de dos temas anteriores “frustrados”. El primer cambio fue cuando me trasladé a mitad del 2021 desde empresa al grupo de investigación CSK, el segundo cambio vino junto con unos partidores “catetes”. La paciencia y tolerancia a la frustración fueron fundamentales. Bueno, nunca se me pasó por la cabeza que iba a terminar trabajando con luces y la verdad que me gustó bastante. Lo que más rescato es la importancia de la interdisciplinariedad en la ciencia, específicamente, como el aporte de los físicos fue fundamental para que los biólogos actualmente pudiéramos comenzar a entender cómo las plantas perciben y responden a la luz.

Voy a usar esta sección para agradecerle infinitamente a mis compañeros de la universidad, a mis amigas y a todo el grupo CSK. Sin duda Christian, Daniela, Rocío y la profesora Claudia me enseñaron los principios para desempeñarme en un laboratorio, ganar confianza en mí misma y poder terminar esta etapa.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.	Introducción.....	1
1.1	Estudio de la luz y su efecto sobre organismos vegetales.....	1
1.2	Función de los carotenoides.....	4
1.3	Regulación por luz de la síntesis de carotenoides en <i>D. carota</i>	5
1.4	Efecto de la luz sobre la elongación del tejido aéreo y raíz de <i>D. carota</i>	7
1.5	Objetivo general y específicos.....	9
1.6	Diseño experimental.....	10
2.	Materiales y Métodos.....	11
2.1	Material vegetal.....	11
2.2	Características de las condiciones de luz.....	11
2.3	Determinación de las condiciones de luz.....	12
2.4	Análisis fenotípico.....	12
2.5	Cuantificación de la concentración de pigmentos.....	13
2.5.1	Extracción de carotenoides y clorofilas.....	13
2.5.2	Cuantificación del contenido total de carotenoides y clorofila.....	13
2.6	Métodos de Biología Molecular.....	14
2.6.1	Extracción de ADN genómico desde hoja de zanahoria.....	14
2.6.2	Extracción ARN desde raíz de zanahoria.....	15
2.6.3	Tratamiento DNAsa I y síntesis de ADNc.....	16
2.6.4	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	17
2.6.5	Electroforesis en gel de agarosa.....	17
2.6.6	Determinación de la expresión relativa de genes mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR).....	18
2.7	Análisis estadístico.....	18
3.	Resultados.....	19
3.1	Determinar la intensidad y calidad de luz otorgada por la luz fluorescente (F), LED1 y LED2 sobre las plantas en crecimiento.....	19
3.2	Determinar el efecto de las luces F, LED1 y LED2 sobre los niveles de expresión relativa de genes clave en síntesis de carotenoides, señalización por luz y desarrollo en raíces de reserva de zanahoria en distintas etapas de desarrollo. 22	
3.3	Analizar el efecto de las luces F, LED1 y LED2 sobre el fenotipo y nivel de pigmentos fotosintéticos en hojas y raíz de reserva de zanahoria en distintas etapas de desarrollo.....	32
4.	Discusión.....	41
4.1	Efecto de las condiciones lumínicas sobre el tejido aéreo.....	41
4.2	Efecto de las condiciones lumínicas sobre la raíz de <i>D. carota</i>	46
4.2.1	Efecto a nivel del fenotipo de la raíz de reserva.....	46
4.2.2	Genes involucrados en vías de señalización por luz.....	49

4.2.3	Genes asociados a desarrollo	52
4.2.4	Adelantamiento del desarrollo secundario de la raíz de reserva de <i>D. carota</i> 54	
4.2.5	Disociación del desarrollo de la raíz y la acumulación de carotenoides en la raíz de reserva.	56
4.2.6	Proyecciones.....	58
5.	Conclusiones	62
6.	Bibliografía	63
7.	Anexo	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Calidad de luz expresada en porcentaje de composición ^a , proporción R/RL ^b e intensidad de luz medida en densidad de flujo de fotones ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) entre 380 y 780 nm.	20
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseño experimental..	10
Figura 2. Esquema de la composición de longitud de onda de las luces F, LED1 y LED2	21
Figura 3. Niveles de expresión relativa de genes de interés en raíz de zanahoria de 4 semanas	23
Figura 4. Niveles de expresión relativa de genes de interés en raíz de zanahoria de 8 semanas.	24
Figura 5. Niveles de expresión relativa de genes de interés en raíz de zanahoria de 12 semanas	25
Figura 6. Niveles de expresión relativa de genes de interés en raíz de zanahoria de 4 semanas	29
Figura 7. Niveles de expresión relativa de genes de interés en raíz de zanahoria de 8 semanas.	30
Figura 8. Niveles de expresión relativa de genes de interés en raíz de zanahoria de 12 semanas	31
Figura 9. Contenido de carotenoides totales en raíz de zanahoria crecidas bajo las condiciones F, LED 1 y LED 2 a las 4, 8 y 12 semanas post germinación	33
Figura 10. Contenido de carotenoides totales en hojas de zanahoria crecidas bajo las condiciones F, LED 1 y LED 2 a las 4, 8 y 12 semanas post germinación	34
Figura 11. Contenido de clorofila a y b en hojas de zanahoria crecidas bajo las condiciones F, LED 1 y LED 2 a las 4, 8 y 12 semanas post germinación	35
Figura 12. Peso de raíces de zanahoria crecidas bajo las condiciones F, LED 1 y LED 2 a las 4, 8 y 12 semanas post germinación	37
Figura 13. Diámetro de raíces de zanahoria bajo las condiciones F, LED 1 y LED 2 a las 4, 8 y 12 semanas post germinación	38
Figura 14. Comparación fenotípica entre raíces de zanahoria de 8 (A) y 12 (B) semanas en la condición F, LED1 y LED2	40

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Luz azul
R	Luz roja
RL	Luz rojo lejano
UV	Luz UV
R/RL	Proporción de luz roja respecto luz rojo lejano
PFD	Densidad de flujo de fotones
PPFD	Densidad de flujo de fotones fotosintéticos
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
LED	Diodo emisor de luz
F	Condición de luz fluorescente
LED1	Condición lumínica LED 1
LED2	Condición lumínica LED 2
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
ARN	Ácido ribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-qPCR	PCR en tiempo real con transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa.
SPG	Semanas post-germinación
ANOVA	Análisis de varianza

RESUMEN

La luz afecta el desarrollo y la síntesis de carotenoides en plantas. En la literatura, se ha demostrado que variar las condiciones de luz posee un efecto sobre el crecimiento de algunas especies vegetales y sobre la acumulación de carotenoides. Para ello, se ha implementado el uso de luces LED (*Light-Emitting Diode*) debido a las ventajas que estas implican en cuanto al control de dos componentes: la calidad y la intensidad de la luz. La primera corresponde a las longitudes de onda (medida en nm) que componen el espectro, mientras que intensidad indica la cantidad de luz (medida como la densidad de flujo de fotones, $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Una de las principales fuentes de carotenoides para el consumo humano corresponde a la zanahoria (*Daucus carota*), en la cual se ha observado que diferentes condiciones de iluminación LED, generan diferencias en la elongación del tallo y raíz. Bajo este antecedente, se propone evaluar el efecto de dos luces LED distintas sobre el desarrollo fenotípico de la raíz de reserva, la acumulación de carotenoides y los niveles de expresión relativa de genes clave involucrados en la síntesis de carotenoides. Para ello, cultivamos zanahorias bajo tres condiciones de luz diferentes: la condición control; luz fluorescente, F que presenta una intensidad de $54.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 5.65 de proporción luz roja/luz roja lejana (R/RL), LED1 ($86.6 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 5.04 R/RL) y LED2 ($165,2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 3,92 R/RL). Al determinar los efectos de las luces LED sobre la raíz de zanahoria, se observó que a las 8 semanas post-germinación, las luces LED1 y LED2 promueven el desarrollo secundario de la raíz de reserva de zanahoria e inducen la expresión de genes clave en la ruta de biosíntesis de carotenoides (*DcPSY1* y *DcPSY2*) respecto al control. Sin embargo, no se hallaron diferencias en el contenido de carotenoides en las raíces. Además de estudiar los efectos de la luz en la raíz, se propuso determinar el contenido de pigmento en las hojas. Se observó que el nivel de clorofila fue menor en las hojas de plantas crecidas en LED2, las que también acumularon antocianinas, lo cual no es característico de hojas de zanahoria y podría

sugerir un nivel de estrés en la planta. Por lo tanto, se concluye que las condiciones lumínicas suministradas por LED1 son las mejores para el crecimiento de zanahoria, ya que induce tempranamente el desarrollo secundario de la raíz de zanahoria, mantiene un contenido óptimo de carotenoides en la raíz y las hojas de las plantas que crecen bajo esta condición presentan niveles de pigmentos acorde a las características fenotípicas de *D. carota*. Estos resultados nos permiten proponer que *D. carota*, una especie de importancia nutricional, puede ser cultivada en sistemas de agricultura vertical bajo condiciones de iluminación LED1, donde se podrían producir raíces maduras antes de 3 meses.

ABSTRACT

Light affects the growth and development of plant organisms. In the literature, it has been shown that varying light conditions has an effect on the growth of some plant species and on the accumulation of carotenoids. For that, the use of LED (*Light-Emitting Diode*) lights has been implemented due to the advantages they offer in terms of controlling two light components: quality and intensity. The former refers to the wavelengths (measure as nm) that compose the spectrum, while the latter refers to the quantity of light (measure as photon flux density, PFD). One of the main sources of carotenoids for human diet is carrot (*Daucus carota*), which stem and root elongation is affected under certain LED lighting conditions. Therefore, in this work it is proposed to evaluate the effect of two different LED lights on the phenotypic development of the reserve root, the accumulation of carotenoids and the relative expression levels of key genes involved in the synthesis of carotenoids. For this purpose, we grew carrots under three different light conditions: the control condition that corresponds to fluorescent light (F) that presents an intensity of $54.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and a 5.65 red/far red ratio (R/FR), LED1 ($86.6 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and 5.04 R/FR) and LED2 ($165.2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and 3.92 R/FR). In assessing the effects of lights on carrot root, it was observed that at 8 weeks post-germination, LED1 and LED2 promote carrot storage root development and induce gene expression of key genes in the carotenoid biosynthesis pathway (*DcPSY1* and *DcPSY2*). However, no differences were observed in the content of carotenoids in the roots compared to the control. In addition to studying the effects of light on the root, it was proposed to determine the pigment content in the leaves, the level of chlorophyll was lower in the leaves of plants grown in LED2, which also accumulated anthocyanins, which is not characteristic of carrot leaves and could suggest a level of stress in the plant. Therefore, we concluded that LED1 is the best condition for carrot growth, since it induces the secondary development of carrot root, maintains an optimal content of carotenoids in the root

and the leaves of the plants grown under this condition present pigment levels according to the phenotypic characteristics of *D. carota*. These results let us to propose that *D. carota*, a species of nutritional importance, can be grown in vertical agriculture under LED1 lighting conditions, where mature roots could be produced before 3 months.

1. Introducción

1.1 Estudio de la luz y su efecto sobre organismos vegetales

La fotobiología estudia la percepción de la luz por parte de las plantas. Esta corresponde a una señal ambiental clave, debido a su participación en procesos como la fotomorfogénesis y la fotosíntesis, impactando sobre el crecimiento y desarrollo de la planta (Martínez-García & Monte, 2020; Spalding & Folta, 2005).

En los últimos 20 años, con el objetivo de estudiar el efecto de la luz sobre las plantas, se ha masificado el uso de luces LED (*Light-Emitting Diode*) en condiciones lumínicas artificiales. A diferencia de otros tipos de luces como aquellas incandescentes o fluorescentes, los LEDs cuentan con características que hacen interesante su uso en investigación ya que permiten comprender los efectos espectrales de la luz en plantas (Cope & Bugbee, 2013), tanto a nivel molecular como morfológico. Este tipo de tecnología de iluminación permite generar espectros de luz específicos para potenciar y estudiar características de interés como es el crecimiento vegetativo, la floración, la acumulación de metabolitos secundarios, inducir resistencia sistémica a hongos patógenos o acelerar los programas de crecimiento de cultivos ("*speed breeding*") (Al Murad et al., 2021; Hasan et al., 2017; SharathKumar et al., 2020). Dichas investigaciones han conducido al uso de luces LED para fines productivos en ciertas especies, dando paso a la masificación de sistemas de cultivos verticales en condiciones de luces LED. Estos se destacan por su eficiencia, ya que corresponden a sistemas de iluminación de menor consumo energético, que a su vez, permiten mejorar la producción y calidad de los cultivos mediante la regulación de las condiciones lumínicas de acuerdo con los requerimientos específicos de la especie en cultivo (Kusuma et al., 2020; Rahman et al., 2021). Sin embargo, para explotar dicho potencial se requiere abarcar el estudio en más especies, ya que actualmente

estos sistemas son aplicados principalmente para la producción vegetales de hojas comestibles (Zha & Liu, 2018).

Para llevar a cabo dichas investigaciones, el uso de luces LED permite el control preciso de la calidad e intensidad de la luz aplicada (Pattison et al., 2018; Kusuma et al., 2020). La calidad corresponde a las longitudes de onda (nm) que compone el espectro, mientras que la intensidad corresponde a la cantidad de luz pudiendo ser cuantificada como la densidad de flujo de fotones (PFD: *photon flux density*, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Swan & Bugbee, 2018). El control y conocimiento de éstas, es una herramienta para entender el efecto de ambas componentes en plantas (Cope & Bugbee, 2013). En 1962, se logró el desarrollo de LEDs rojos, y luego en 1994, de LEDs azules. Ambos espectros eran interesantes debido a que los fotones emitidos con una longitud de onda perteneciente al rango del rojo y el azul corresponden con el espectro de absorción de la clorofila (Johnson, 2016), y por tanto, tienen un impacto positivo sobre la fotosíntesis. Sin embargo, es la generación de LEDs blancos a partir de LEDs azules lo que constituye un precedente para la tecnología, haciendo merecedores del Nobel de Física del 2014 a sus inventores (Heber, 2014). Los LEDs blancos, además de ser energéticamente más eficientes y económicamente más accesibles, describen un espectro de luz enriquecido en fotones con una longitud de onda en el rango de los 400 y 700 nm, lo cual es conocido como radiación fotosintéticamente activa (PAR: *Photosynthetic Active Radiation*). A su vez permiten una mejor percepción al ojo humano y asemejan las condiciones de luz natural (Kusuma et al., 2020).

A la fecha se ha descrito el efecto sobre tejido fotosintético de fotones emitidos por luces LED. Se ha reportado que los fotones provenientes de la radiación ultravioleta (400-100 nm) pueden ser dañinos, sin embargo, pueden presentar un efecto positivo en el aumento de metabolitos secundarios (Kusuma et al., 2020). El aumento de la

fracción de luz azul (400-500 nm) ha demostrado inhibir la división y expansión celular, teniendo por consecuencia una reducción en el área foliar, en la captura de fotones y en el crecimiento de la planta, sin embargo, se ha demostrado que la presencia de una pequeña fracción de luz azul permite mejorar el rendimiento fotosintético de las plantas (Dougher & Bugbee, 2004). Los fotones con una longitud de onda en el rango conocido como luz verde (500-600 nm) permiten una mejor percepción del color por parte del ojo humano, debido a que son menos absorbidos por los fotopigmentos. Sin embargo, cierta fracción de luz verde (no absorbida por la clorofila de capas superiores del tejido) podría penetrar el tejido y excitar fotosistemas en capas celulares más profundas (Kusuma et al., 2020; Liu & Iersel, 2021). Los fotones con una longitud de onda en el rango conocido como luz roja (600-700 nm) han demostrado ser fotosintéticamente eficientes, mientras que los fotones de una longitud de onda en el rango conocido como luz rojo lejano (700-800 nm), tiene un efecto positivo sobre el crecimiento y alargamiento del tallo de la planta, promoviendo la expansión del área foliar, por ej. en lechuga (Meng et al., 2019), y la elongación de tallo en plantas de tomate (Zhang et al., 2019). A pesar de ello, Bugbee (2016) indica que no es posible aseverar que se replique el mismo efecto sobre todas las especies vegetales en condiciones de múltiples longitudes de onda, por lo que es necesario el estudio especie específico en comunidades de plantas.

Al respecto, Cope et al., (2014), estudió el efecto de variaciones en el porcentaje de luz azul (LEDs) sobre el crecimiento y desarrollo de rábano. Determinó que al aumentar el porcentaje de luz azul, se produjo una reducción en la elongación del tallo y de la raíz de almacenamiento. Por otro lado, un aumento en el porcentaje de luz azul, acompañado de un aumento en la cantidad de fotones con una longitud de onda en el rango de los 400 y 700 nm (conocidos como fotones fotosintéticamente activos), producía un aumento en la concentración relativa de clorofila y del peso

seco de hojas más tallo. Sin embargo, un porcentaje de luz azul mayor al 30% producía una disminución de la concentración de la clorofila y del peso seco.

Además de los efectos registrados a nivel del crecimiento de las plantas, se ha reportado el efecto a nivel molecular de la calidad de la luz. En el caso de plantas de tomate, Bao-xing et al., (2019), observó que al suplementar con LED azul (430 nm) o LED rojo (660 nm) en período de antesis, los frutos desarrollados aumentaban su contenido de β -caroteno, carotenoide de color anaranjado. A su vez, la expresión relativa de *PSY1* (gen que codifica para la enzima de fitoeno sintasa y que, que corresponde uno de los genes clave para la biosíntesis de carotenoides) se vió inducida ante ambos tratamientos respecto al tratamiento control (luz natural). Esto constituye un antecedente de cómo la calidad de la luz afecta positivamente la expresión génica de un gen asociado a la ruta carotenogénica y la acumulación de un metabolito secundario perteneciente al grupo de los carotenoides.

1.2 Función de los carotenoides

Los carotenoides corresponden a pigmentos isoprenoides de naturaleza liposoluble. En la naturaleza son sintetizados por algunas bacterias, hongos, algas y plantas terrestres (López et al., 2021; Sandmann, 2022; Takaichi, 2011). Sin embargo, una de las fuentes principales de carotenoides en la naturaleza son las plantas, las cuales sintetizan y acumulan dichos pigmentos en los plastidios: cloroplastos y cromoplastos (Rosas-Saavedra & Stange, 2016). Los carotenoides poseen un rol funcional en la planta. A nivel de tejido fotosintético, estos se acumulan en los cloroplastos y participan de la fotosíntesis mediante su acción en el complejo antena. Esto permite que los carotenoides actúen como pigmentos accesorios, ya que amplían el rango de absorción de luz. Además, les otorga un rol fotoprotector frente al daño oxidativo, debido a que disipan el exceso de energía lumínica y participan en la eliminación de

especies reactivas de oxígeno (Rosas-Saavedra & Stange, 2016). Por otro lado, los carotenoides son precursores de fitohormonas tal como el ácido abscísico (ABA) (Sah et al., 2016) y estrigolactonas (Ruyter-Spira et al., 2013), las cuales participan en la respuesta a estímulos de estrés (ej. osmótico) y en la regulación del desarrollo de ramificaciones y de la raíz (Kapulnik et al., 2011), respectivamente. Por otro lado, en tejido no fotosintético, los carotenoides son sintetizados y acumulados en cromoplastos (plastidios especializados en acumular pigmentos), lo cual le confiere un color característico a órganos como frutos y flores. Entre ellos es posible identificar distintos tipos de carotenoides, tal como la luteína que confiere el color amarillo; el licopeno el color rojo; el β -caroteno el color anaranjado; entre otros. Por consecuencia, la diversidad de colores que le otorgan a los órganos posee un rol como atrayente de insectos en la polinización (Yuan et al., 2015).

Actualmente, se conocen los genes que codifican para las enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de carotenoides. Uno de los genes claves de la ruta es *PSY*, este codifica para la enzima fitoeno sintasa, la cual cataliza la primera reacción específica de la ruta de biosíntesis de carotenoides donde se produce el fitoeno. Este intermediario sufre una serie de reacciones de deshidrogenaciones e isomerizaciones dado por las enzimas codificadas por los genes *ZDS*, *PDS*, *CRTISO* y *Z-ISO*, sintetizando el trans- licopeno. Luego participan las enzimas LCYB y LCYE, las cuales utilizan como sustrato al licopeno para la síntesis del α -caroteno y β -caroteno. Cabe mencionar, que los genes carotenogénicos que conforman la vía de síntesis se encuentran altamente regulados por señales de desarrollo y del entorno, tal como la luz (Rosas-Saavedra & Stange, 2016).

1.3 Regulación por luz de la síntesis de carotenoides en *D. carota*.

En la literatura es posible encontrar que uno de los factores externos esenciales para que ocurra la síntesis de carotenoides en plantas modelos como *Arabidopsis*

thaliana, *Nicotiana tabacum* (tabaco) y *Solanum lycopersicum* (tomate), es la presencia de luz blanca, cuya composición abarca longitudes de onda correspondiente a los rangos de luz azul, verde, roja y roja lejano. Además, se caracteriza por una alta proporción de luz roja respecto a luz rojo lejano (R/RL) (Quian-Ulloa & Stange, 2021). Esta luz blanca corresponde a un estímulo que posee un efecto positivo sobre la síntesis de carotenoides en órganos como frutos y hojas (Llorente et al., 2017; Quian-Ulloa & Stange, 2021). Sin embargo, antagónicamente, una de las principales fuentes de carotenoides de la naturaleza, la zanahoria (*Daucus carota*), presenta un efecto negativo de la luz sobre la síntesis de carotenoides en la raíz de reserva que crece bajo suelo. Los resultados de Fuentes et al., (2012), demuestran que la porción de raíz que crece expuesta a la luz blanca (R/L) presenta una menor expresión relativa de genes carotenogénicos (*PSY1* y *PSY2*) y un menor contenido de carotenoides a las 4, 8 y 12 semanas de desarrollo. Por otro lado, la porción de raíz que crece en oscuridad bajo tierra (R/O) describe un aumento en los niveles de expresión relativa de los genes implicados en la ruta de biosíntesis de carotenoides y un aumento en el contenido de carotenoides. Estos resultados demuestran que la luz blanca regula transcripcionalmente a los genes carotenogénicos y además posee un efecto sobre el contenido de carotenoides en la raíz de reserva de *D. carota*.

Por otro lado, Arias et al., (2020) mediante un análisis del transcriptoma de las regiones R/L y R/O, identificó genes regulados por luz que se expresan en mayor medida en R/O que en R/L. Entre estos se encuentra *DcPHYA* y *DcPHYB*, corresponden a genes que codifican para los fitocromos A y B, respectivamente encargados de sensar variaciones de proporción R/RL; siendo *PHYA* activo en baja proporción R/RL y *PHYB* en alta R/RL (Quian-Ulloa & Stange, 2021). *DcPAR1*, codifica para el co-factor transcripcional PHYTOCHROME REGULATED 1, el cual se une e interactúa con los factores transcripcionales PIFs (*PHYTOCHROME-*

INTERACTING FACTORS) (Zhou et al., 2014), que son conocidos represores de la fotomorfogénesis. Por otro lado, también identificó una mayor expresión en la región R/O de los genes *DcARF6* y *DcARC6*. El gen *ARF6*, codifica para un factor de transcripción que regula la expresión de genes de respuesta a auxina (Li et al., 2016), mientras que *ARC6* se asocia a la división y replicación del cloroplasto (Ma & Li, 2018). Los resultados permitieron sugerir que estos genes podrían tener un rol regulatorio sobre los procesos de desarrollo y/o síntesis de carotenoides en la raíz de zanahoria (Arias et al., 2020).

1.4 Efecto de la luz sobre la elongación del tejido aéreo y raíz de *D. carota*

Considerando lo expuesto anteriormente, en nuestro grupo de investigación nos preguntamos si plantas de zanahoria verían afectado su crecimiento en diferentes condiciones lumínicas. Es así como Gonzalez-Calquin (2021, datos sin publicar), observó el crecimiento de plantas de zanahoria a las 4, 8 y 12 semanas post-germinación en dos espectros de luces LED distintos: condiciones AP67 (llamada desde ahora LED1) y NS12 (llamada desde ahora LED2) y las comparó con luces fluorescentes (F), que corresponden a las luces de uso habitual en las condiciones de invernadero del grupo de investigación. Los espectros de LED1 y LED2 fueron diseñados por el fabricante (Valoya, Finlandia) para fines de investigación y son utilizados por rigurosas instituciones de investigación como Max Planck (Köhl et al., 2017; Mérai et al., 2019). LED1 posee un espectro de características de LED blanco de uso general para el crecimiento de los cultivos, mientras que las luces LED2 potencian el cultivo de tejidos y el crecimiento vegetativo. Los tiempos de crecimiento seleccionados corresponden a etapas claves para el desarrollo de la raíz, siendo las 4 semanas una etapa inicial donde la raíz posee un fenotipo delgado y pálido, luego a las 8 semanas se comienza a evidenciar el engrosamiento y la acumulación de

carotenoides en la raíz y a las 12 semanas es donde se alcanza la madurez de la raíz de reserva (Fuentes et al., 2012; Simpson et al., 2016). Se observó que a las 4 y 8 semanas aquellas plantas crecidas bajo la condición LED2 poseen una mayor elongación de la parte aérea (Figura S1) respecto a los grupos que crecieron bajo la condición F y LED1. Por otro lado, a las 8 semanas de crecimiento, la raíz de las zanahorias crecidas bajo condición LED1 y LED2 poseen una mayor elongación que la raíz de las plantas crecidas bajo la condición F (Figura S2). Estos antecedentes indican que las plantas de zanahoria presentan diferencias en la elongación de la parte aérea y en la raíz de reserva como respuesta a las condiciones lumínicas suministradas. Considerando estos resultados preliminares surge la pregunta de si las diferencias en la elongación de la planta de zanahoria estarían también acompañadas por un cambio en el desarrollo, en los niveles de expresión génica relativa de genes clave en la raíz de reserva y en el contenido de pigmentos carotenoides.

1.5 Objetivo general y específicos

Objetivo general

Evaluar el efecto de dos condiciones de luz LED distintas sobre el desarrollo fenotípico de la raíz, los niveles de expresión relativa de genes clave en la raíz de reserva de zanahoria, y la acumulación de carotenoides.

Objetivos específicos

OE1: Determinar la intensidad y calidad de luz que otorga la luz fluorescente (F), LED1 y LED2.

OE2: Determinar el efecto de las luces F, LED1 y LED2 sobre los niveles de expresión relativa de genes clave en la síntesis de carotenoides, señalización por luz y desarrollo en raíces de zanahoria en distintas etapas de desarrollo.

OE3: Analizar el efecto de las luces F, LED1 y LED2 sobre el fenotipo de raíz y el contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas y en la raíz de reserva de zanahoria en distintas etapas de desarrollo.

1.6 Diseño experimental

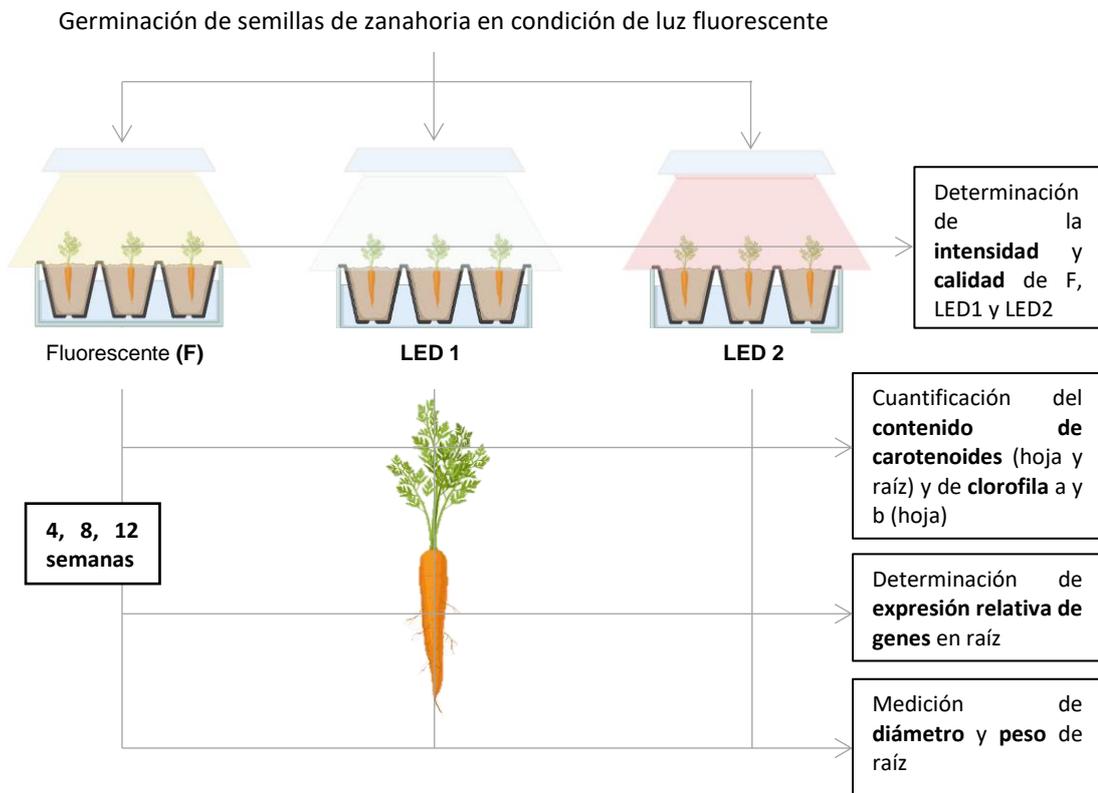


Figura 1. Diseño experimental. Se contempló la germinación de semillas de zanahoria en tres bandejas bajo la condición de luz fluorescente (F). Una vez alcanzada la germinación, se mantuvo una bandeja en la condición F, mientras que una segunda y tercera bandeja se trasladaron a las condiciones LED1 y LED2. Las actividades contempladas corresponden a la determinación de intensidad y calidad luz; cuantificación del contenido de pigmentos en tejido aéreo y radicular; medición de parámetros fenotípicos y la determinación de expresión relativa de una selección de genes de interés.

El diseño experimental (Figura 1) contempla el crecimiento de plantas de zanahoria bajo tres condiciones de luz: fluorescente (F), LED1 y LED2, durante 4, 8 y 12 semanas post-germinación. La condición F corresponde a la situación control, mientras que LED1 y LED2 corresponden a condiciones experimentales. A cada condición de luz se le determinó la intensidad y calidad. Una vez cumplidas las 4, 8 y 12 semanas post-germinación, se realizó la recolección del material vegetal para la determinación del contenido de pigmentos en tejido aéreo y radicular, además de la determinación del peso y diámetro de las raíz. Por último se realizó un análisis de expresión relativa de genes asociados a la síntesis de carotenoides, señalización por luz y desarrollo en raíz de reserva.

2. Materiales y Métodos

2.1 Material vegetal

Se sembraron semillas de zanahoria de la variedad Nantesa en tres bandejas de 50 cavidades bajo condición de luz fluorescente (F), fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, utilizando como sustrato una mezcla 2:1 de tierra de hoja y vermiculita. Una vez germinadas las semillas, se procedió a trasladar una bandeja a las condiciones lumínicas LED1, otra bandeja a la condición lumínica LED2 y una tercera bandeja se mantuvo bajo la condición control F (las tres condiciones bajo fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad). Las plantas fueron regadas dos veces por semanas utilizando medio hidropónico. Se realizó recolección del material vegetal a las 4, 8 y 12 semanas post germinación.

2.2 Características de las condiciones de luz

La condición control corresponde a luces fluorescentes utilizadas como condición estándar en el invernadero del grupo de investigación. Las condiciones experimentales corresponden a luces LED de marca Valoya Serie PLGL-L de 28 W. Esta serie cuenta con la ventaja de poder instalarse en sistemas de luces fluorescentes, además, están diseñada para poder ser utilizadas en cámaras de cultivo, fitotrones y agricultura vertical. Específicamente los modelos utilizados corresponden a aquellos identificados por el espectro NS12 y AP67. Ambos diseñados y ofrecidos por el fabricante para su uso en investigación. De acuerdo con éste, NS12 se identifica por ser un espectro neutro que asemeja condiciones de iluminación natural, sin efectos potenciadores específicos, recomendando su uso para propósitos generales en cualquier etapa de crecimiento de la planta. En cambio, AP67 corresponde a un espectro que está diseñado para promover el crecimiento

vegetativo, cultivo de tejidos y la floración. Para el presente trabajo los espectros denominados por el fabricante como NS12 y AP67 corresponden con las condiciones denominadas LED1 y LED2, respectivamente.

2.3 Determinación de las condiciones de luz

Se utilizó un espectrómetro (LI-180, LICOR) para determinar la densidad del flujo de fotones (PFD) en el rango de los 380 y 780 nm (capacidad límite del equipo) en cada una de las condiciones de luz. La medición se realizó posicionando el sensor óptico del equipo a la altura de crecimiento de la parte aérea de las plantas de zanahoria haciendo uso del modo “variables” y la herramienta “captura”. Para la visualización y acceso a los datos se conectó el equipo al computador y se utilizó el software del fabricante (*LI-180 Spectrofotometer Software*). El archivo desplegado contiene la data correspondiente al perfil del espectro, PFD por rango de longitud de onda, PFD totales. Estos datos fueron tabulados y graficados mediante GraphPAD 8 Prism. Se utilizaron los datos de una única medición. Para calcular la proporción R/RL (proporción luz roja respecto luz rojo lejano), se obtuvo el cociente entre los fotones provenientes del rojo (600-700 nm) y el rojo lejano (700-780 nm) (Kusuma & Bugbee, 2021).

2.4 Análisis fenotípico

Para la determinación del diámetro de las raíces de zanahoria se realizó un corte transversal de raíz de 10 individuos por condición de luz. Para ello, se utilizó como criterio el corte de la región más gruesa de cada raíz seleccionada. El diámetro calculado por disco de raíz corresponde al promedio de cuatro mediciones. Para determinar el peso de las raíces, se seleccionaron 10 raíces de zanahorias de cada

condición lumínica y se registró el peso fresco en una balanza analítica (error +/- 0,003 g; WTB 200, Radwag). Se utilizó un set de estudio fotográfico portátil para el registro fotográfico y se realizó la determinación del diámetro mediante ImageJ.

2.5 Cuantificación de la concentración de pigmentos.

2.5.1 Extracción de carotenoides y clorofilas

Se masaron entre 50-100 mg de tejido de hojas y de raíces, el cual fue congelado con nitrógeno líquido para proceder con la molienda haciendo uso de un mortero. Se agregaron 2 mL de solución 2:1:1 de hexano:acetona:etanol. Se traspasó el volumen a un tubo de 15 mL y se procedió a agitar vigorosamente mediante vortex. Se incubaron en hielo las muestras en condiciones de oscuridad durante 2 min. Luego, se centrifugó a 14.000 x g durante 10 min a 4°C. Se recuperó la fase superior en tubos de 15 mL y se secó el contenido sumergiendo el tubo en nitrógeno líquido durante 2 min. Finalmente, se liofilizaron las muestras.

2.5.2 Cuantificación del contenido total de carotenoides y clorofila

Se resuspendió el extracto obtenido agregando 1 mL de acetona y se procedió a medir el contenido de pigmentos mediante espectrofotometría (JENWAY 6300). Para ello, en una cubeta de cuarzo se diluyó cuatro veces la muestra de carotenoides en acetona. La absorbancia fue medida a las siguientes longitudes de onda: 474 nm (absorción de carotenoides), 645 nm (absorción de clorofila a), 662 nm (absorción clorofila b) y 750 nm (medición de turbidez). Para el cálculo de la concentración de cada pigmento se utilizaron las ecuaciones descritas por Lichtenthaler y Buschmann, (2001):

$$C_a \left(\frac{ug}{mL} \right) = 11,75 \cdot A_{662} - 2,35 \cdot A_{645} \quad (1)$$

$$C_b \left(\frac{ug}{mL} \right) = 18,61 \cdot A_{645} - 3,96 \cdot A_{662} \quad (2)$$

$$C_t \left(\frac{ug}{mL} \right) = \frac{1000 \cdot A_{474} - 2,27 \cdot C_a - 81,4 \cdot C_b}{214} \quad (3)$$

Donde Ca, Cb y Ct corresponden a la concentración expresada en ug/mL de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales, respectivamente. Para informar el contenido de carotenoides según el peso de la muestra, el valor Ct (ug/mL) fue multiplicado por el factor de dilución (40) y el volumen de resuspensión (1 mL) y dividido por el peso fresco. Finalmente, el contenido de pigmento es expresado en ug/g de peso seco, para ello se dividió por un factor de conversión, ya sea 0.285 o 0.098, para hojas o raíz, respectivamente. Estos fueron calculados a partir del peso después y antes de someter a deshidratación muestras de tejido (Rosas C., 2014).

Para la determinación de fotopigmentos, tanto para raíz como para hojas y para cada uno de los tiempos de estudio (4, 8 y 12 semanas) se utilizaron 4 réplicas biológicas por condición lumínica (en el caso de las réplicas biológicas de 4 semanas, cada una fue obtenida a partir de un pool de 3-4 plantas) y 2 réplicas técnicas, las cuales fueron promediadas.

2.6 Métodos de Biología Molecular

2.6.1 Extracción de ADN genómico desde hoja de zanahoria

Se llevó a cabo el protocolo descrito por Doyle & Doyle, (1987). Se masaron 120 mg de hoja de zanahoria (por triplicado), el tejido fue congelado y homogenizado en presencia de nitrógeno líquido con 600 uL de buffer de extracción (CTAB 2%, EDTA

23 mM, NaCl 2M, Tris-HCl 100 mM,), 4 uL de β -mercaptoetanol y PVP 1%, previamente calentado a 65°C. El homogenizado fue transferido a tubos de 1,5 mL y se dejó incubar a 60°C por minutos en agitación (1000 rpm). Luego, se agregaron 400 uL de de solución 24:1 de cloroformo:alcohol isoamílico, se vortexeó y centrifugó a 13.000 rpm por 10 min. Se procedió a recuperar la fase acuosa en un nuevo tubo, se agregó un volumen de isopropanol y se dejó precipitar por 10 min a -80°C. Se continuó centrifugando a 13.000 rpm por 10 min y se lavó el pellet con etanol 75%. Se continuó con una centrifugación a 13.000 rpm por 10 min y luego se eliminó el etanol. Finalmente, se resuspendió el ADN en 50 uL de agua libre de nucleasas. Para verificar la susceptibilidad del ADN génomico (ADNg) extraído a PCR, se les realizó a las muestras un PCR convencional de *actina4* (Programa en Tabla I, sección Anexo). El ADNg fue utilizado como control positivo para PCR convencional de *actina4*.

2.6.2 Extracción ARN desde raíz de zanahoria.

Se masaron entre 100-200 mg de tejido de raíz, el cual fue congelado y homogenizado en mortero en presencia de nitrógeno líquido con 1 mL de buffer de extracción (CTAB 2%, PVP40 2%, EDTA 23 mM, NaCl 2M, Tris-HCl 100 mM, trihidroclorato de espermidina 0,05% y β -mercaptoetanol 2%) previamente calentado a 65°C. Luego, se traspasó el contenido a tubos de 2 mL, se vortexeó y se incubó a 65°C durante 20 min a 1000 rpm. Se procedió a añadir 1 mL de solución 24:1 de cloroformo:alcohol isoamílico, luego se vortexeó y centrifugó a 12.000 x g durante 15 min a 4°C. Se rescató el sobrenadante y se repitió el procedimiento con cloroformo: alcohol isoamílico. Se rescató el sobrenadante y se añadió un volumen de LiCl 10M, se invirtió cuidadosamente y se dejó precipitando a -20°C durante la noche. Al día siguiente se centrifugó a 12.000 x g por 20 min a 4°C. Se eliminó el

sobrenadante por inversión y se añadió 1 mL de etanol 70% DEPC. Luego, se centrifugó a 16.000 x g a 4°C. Se eliminó el etanol y se resuspendió el precipitado en 30 uL de buffer TE DEPC (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM). Finalmente, utilizando 1 uL se realizó la cuantificación del ARN mediante nano espectrofotometría (NanoVue, Healthcare Bio-Sciences) y se verificó la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 40 min a 80 V.

La extracción de ARN consideró 3-4 réplicas biológicas por condición lumínica (en el caso de 4 semanas, cada replica se obtuvo a partir de pool de 3-4 raíces).

2.6.3 Tratamiento DNAsa I y síntesis de ADNc

Para eliminar trazas de ADN remanente se trató el ARN extraído con DNAsa I. Para ello se utilizó, por reacción, 1 uL de inhibidor de ARNasa Ribolock (ThermoFisher), 1 uL de DNAsa I (ThermoFisher), y 2 uL de buffer de DNAsa I. Se añadió el volumen necesario de ARN de forma tal de agregar 3 mg del ácido nucleico y el agua necesaria para completar 20 uL de reacción. Se incubaron las muestras a 37°C por 40 min, luego, para detener la reacción se agregó 1 uL de EDTA 50 mM y se dejó incubar a 65°C por 10 min. Para la síntesis de la hebra complementaria, en un tubo de 0,2 mL se agregaron 1,5 uL de oligo AP (5' CGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T 3') 10 uM y 9 uL de ARN tratado con DNAsa I. Se incubó a 70°C por 5 min, luego, se trasladaron los tubos a hielo y se agregaron, por reacción, 0,5 uL de Ribolock, 1 uL de dNTPs 10 mM, 1 uL de agua, 3 uL de MgCl₂ 50 mM, 4 uL de buffer RT 5X (Improm) y 1 uL de la enzima RT (Improm). Luego, se continuó con el programa señalado en la Tabla II, sección Anexo.

2.6.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para comprobar la ausencia de ADN genómico post tratamiento con DNAsa I y la integridad de la molécula de ADNc, se realizó un PCR del gen de *actina 4*. Para ello se utilizó 6,5 uL de enzima Safiro 2X (Takara), 0,2 uL de cada partidor 10 uM (Actina4.F y Actina4.R, Tabla I sección Anexo), 5,1 uL de agua y 1 uL de ARN tratado con DNAsa I o 1 uL de una dilución 1:10 de ADNc. Se utilizó el programa de PCR señalado en la Tabla I, sección Anexo. Como control positivo se utilizó ADN genómico extraído de hoja de zanahoria.

2.6.5 Electroforesis en gel de agarosa

Para las muestras de ARN, los geles fueron preparados al 2% de agarosa en solución TAE 1X DEPC. Por muestra se cargaron 7 uL totales (1 uL de ARN, 2 uL de buffer de carga Orange 6X, 5 uL de agua tratada con DEPC). La electroforesis se realizó a 80V durante 30 min. Para las muestras de ADNc, los geles fueron preparados al 1% de agarosa en solución TAE 1X, por muestra se cargaron 7 uL (1 uL de una dilución 1:10 de ADNc, 2 uL de buffer de carga Orange 6X, 5 uL de agua). La electroforesis se realizó a 90V durante 40 min. En ambos casos se añadió bromuro de etidio (1 ug/mL) y se utilizó un marcador molecular para ácidos nucleicos de 1 Kb (GeneRuler 1 Kb, ThermoFischer). Finalmente, cada gel fue visualizado en un transiluminador (MultiGenius, Syngene) mediante el software GeneSnap.

2.6.6 Determinación de la expresión relativa de genes mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR)

Por reacción se utilizaron 6,5 uL de master mix 2X Evagreen Forget-Me-Not (Biotium) + ROX, 0,4 uL de cada set de partidores 10 uM (Tabla III, sección Anexo), 2,1 uL de agua y 4 uL de templado (10 ng de cDNA). Se utilizó el programa señalado en la Tabla IV utilizando el software MxPro y el equipo MxPro 3000P (Agilent Technologies). Para el análisis de cada gen se realizaron cuatro replicas biológicas por condición de luz (Cada réplica biológica fue obtenida a partir de la extracción de ARN de un pool, considerando un pool la cantidad de tejido necesaria para alcanzar entre 100 y 200 mg) y dos réplicas técnicas. La cuantificación de la expresión relativa se realizó mediante el método propuesto por Pfaffl (2001), utilizando como condición calibradora el tratamiento F y como gen de referencia a *actina4* (4 y 12 semanas) o *ubiquitina* (8 semanas).

2.7 Análisis estadístico

Los datos de expresión génica relativa, contenido de fotopigmentos y parámetros fenotípicos fueron graficados y analizados utilizando el software GraphPAD 8 Prism. Para estos se utilizaron gráficos de barra, en los cuales se representa la media y desviación estándar de los datos. Se utilizó la prueba t de Student ($p < 0,05$) con corrección de Welch para calcular las diferencias de los resultados entre las tres condiciones de luz para cada semana estudiada (4, 8 y 12 semanas). Para la comparación de los resultados de una misma condición de luz a las 4, 8 y 12 semanas se utilizó la prueba ANOVA de una vía ($p < 0,05$) con corrección de Brown-Forsythe y Welch para comparaciones múltiples. En los casos donde se eliminaron datos atípicos se utilizó el método de ROUT con una sensibilidad equivalente a $Q=1\%$.

3. Resultados

3.1 Determinar la intensidad y calidad de luz otorgada por la luz fluorescente (F), LED1 y LED2 sobre las plantas en crecimiento.

Para evaluar la calidad e intensidad de la luz se estudian por lo general dos parámetros: la calidad de la luz (medido en nm) y la densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD: *Photosynthetic Photon Flux Density*; haciendo referencia a los fotones con una longitud de onda en el rango de la radiación fotosintéticamente activa) (Cope et al., 2014; Swan & Bugbee, 2018). La calidad se refiere a las longitudes de onda (nm) que comprenden el espectro de luz: luz UV (100-400 nm); azul (400-500 nm); verde (500-600 nm); rojo (600-700 nm); rojo lejano (700-800 nm), teniendo este parámetro un efecto sobre el fenotipo y el rendimiento de plantas (Kusuma et al., 2020). La intensidad da cuenta de la cantidad de fotones en una superficie por unidad de tiempo en un determinado rango de longitud de onda. Cabe señalar que, antiguamente sólo se consideraba los fotones con una longitud de onda en el rango de los 400 y 700 nm (Radiación fotosintéticamente activa), ya que se consideraban estos fotones como los únicos que promovían la fotosíntesis y que tenían un efecto sobre el desarrollo de la planta. Sin embargo, autores han demostrado el efecto de los fotones de la luz rojo lejano (700-800 nm) sobre el desarrollo de la planta y postulan que estos deben ser considerados en trabajos donde se estudie el efecto de la luz (Kong & Nemali, 2021; Zhen et al., 2021; Zhen & Bugbee, 2020). De la misma forma ocurre con la contribución de los fotones con longitudes de onda en el rango UV (100-400 nm) (Van Gelderen et al., 2018). Por lo anterior, en este trabajo se cuantificó la densidad de flujo de fotones (PFD: *Photon flux density*, medido en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) entre los 380 y 780 nm, considerando la

contribución de fotones con una longitud de onda correspondiente al rango de luz UV y rojo lejano, y la capacidad límite del espectrómetro utilizado (LI-180, LICOR).

En este trabajo, para conocer la calidad de luz proporcionada por las condiciones F, LED1 y LED2, se cuantificaron los fotones con una longitud de onda en el rango correspondiente a luz UV, azul, verde, roja y del rojo lejano. Para luego, determinar el porcentaje de composición de cada tipo de luz en cada condición lumínica (Tabla I). En términos de intensidad de luz, se cuantificó la densidad de flujo de fotones (PFD), obteniendo valores de 54.5, 86.6 y 165.2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fotones en las condiciones F, LED1 y LED2 (Tabla I), respectivamente.

Tabla I. Características espectrales de las condiciones F, LED1 y LED2. Calidad de luz expresada en porcentaje de composición^a, proporción R/RL^b e intensidad de luz medida en densidad de flujo de fotones ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) entre 380 y 780 nm.

Tratamiento	Porcentaje de composición (%)					Proporción R/RL	PFD totales ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
	UV	Azul	Verde	Rojo	Rojo lejano		
F	0,9	29,0	45,9	20,6	3,6	5.65	54,5
LED 1	0,4	18,3	35,3	38,4	7,6	5.04	86,6
LED 2	0,1	11,6	18,9	55,3	14,1	3.92	165,2

^a UV (380-400 nm); azul (400-500 nm); verde (500-600 nm); rojo (600-700 nm); rojo lejano (700-780 nm).

^b La proporción es calculada como el cociente entre los fotones del rojo (R; 600-700 nm) y del rojo lejano (RL; 700-780 nm).

Para una mejor apreciación de la composición de cada espectro, la calidad de luz fue graficada en la figura 2. Si se compara el porcentaje de composición de las tres condiciones: F, LED1 y LED2, se observa que la composición en el rango de luz azul (400-500 nm) y verde (500-600 nm) se presenta en el siguiente orden decreciente F>LED1>LED2, mientras que la composición del rojo (600-700 nm) y rojo lejano (700-

780 nm) presenta el siguiente orden creciente $F < LED1 < LED2$. En cuanto a la luz UV (380-400 nm), en las tres condiciones lumínicas no se alcanza un 1% de composición. Frente a los porcentajes alcanzados por los otros tipos de luz, la luz UV presente es mínima, por lo que para efectos de este trabajo no se considerará su incidencia. Considerando los valores de la Tabla I, es que la condición F se compone mayoritariamente de luz azul y verde; la condición LED1 de luz roja y verde; y LED2 de luz roja. Esta última condición, además, posee un 14% de luz rojo lejano, lo que corresponde al doble y quíntuple respecto a F y LED1, respectivamente.

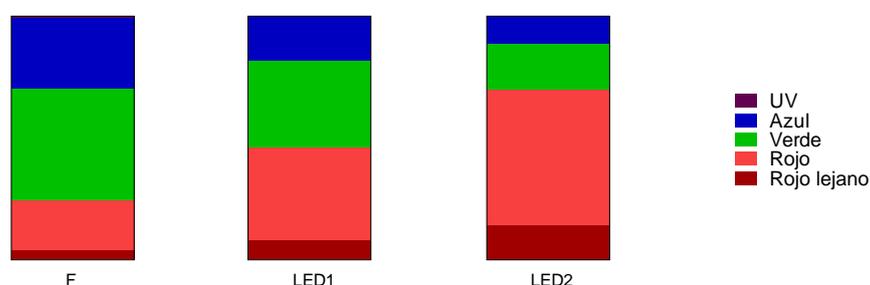


Figura 2. Esquema de la composición de longitud de onda de las luces F, LED1 y LED2 (basado en los porcentajes de la Tabla I).

Al analizar por sí solo la componente intensidad lumínica (PFD, Tabla I), ésta sugiere que las condiciones otorgadas por LED1 y LED2 son mejores condiciones de crecimiento para zanahoria, debido a que ambas condiciones experimentales tendrían 1.6 y 3 veces más fotones, respecto a la condición F, lo cual promovería la fotosíntesis y desarrollo de la planta. Precisamente, Gonzalez-Calquin (2021, datos sin publicar) determinó que bajo estas condiciones a las 8 semanas se inducía una mayor elongación de tallo y raíz (Figura S1 y S2).

Además, se determinó la proporción R/R, la cual corresponde a la proporción de luz del rango del rojo (600-700 nm) respecto a la luz del rango del rojo lejano (700-780) (Tabla I). Esta proporción es calculada ya que una alta proporción R/RL promueve una mayor tasa de fotosíntesis, mientras que una baja proporción R/RL simularía

condiciones de sombra, y por tanto, menos fotosíntesis. En las condiciones lumínicas, se observa que la proporción R/RL se presenta en el siguiente orden F>LED1>LED2.

Considerando estos resultados, es que se da cuenta del grado de heterogeneidad, en relación a la calidad e intensidad de luz, entre las condiciones lumínicas F, LED1 y LED2.

3.2 Determinar el efecto de las luces F, LED1 y LED2 sobre los niveles de expresión relativa de genes clave en síntesis de carotenoides, señalización por luz y desarrollo en raíces de reserva de zanahoria en distintas etapas de desarrollo.

Uno de los objetivos de este trabajo corresponde a conocer si existe un efecto de las distintas condiciones de luz sobre la abundancia relativa de un set de genes de interés seleccionados, por lo que se debe determinar la expresión relativa de estos genes mediante RT-qPCR. Para ello, se debe realizar la extracción de ARN a partir del material vegetal de interés, en este caso corresponde a tejido de raíz de zanahoria de 4, 8 y 12 semanas de crecimiento post-germinación crecidas en las condiciones lumínicas F, LED1 y LED2. Contando con el ARN, se debe realizar la síntesis de ADNc, el cual corresponde al templado de la reacción de qPCR.

Por lo tanto, para cada condición lumínica, se realizó la extracción de ARN a partir de 4 réplicas biológicas (debido a la disponibilidad de material a las 4 semanas cada réplica correspondía a un pool de 3-4 raíces), posteriormente, se determinó mediante espectrofotometría la pureza de la extracción y la concentración de ARN obtenida. Los criterios utilizados para determinar la pureza fueron los siguientes valores de absorbancia: A260/280 y A260/230 cercano a 2 y dentro del rango 2.0-2.2,

respectivamente (Matlock, 2015); y una concentración mínima de ARN de 300 ng/uL. Cumplidos estos criterios, se procedió a analizar la integridad del ARN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 3), esto con el fin de determinar que no se haya degradado el ARN durante la extracción. En la figura 3, se observan las bandas correspondientes al ARN extraído de raíces de 4, 8 y 12 semanas post-germinación. En cada carril correspondiente a muestra es posible observar la presencia de dos bandas nítidas correspondientes a las subunidades menor y mayor de ARN ribosomal, 18S y 28S, respectivamente. Esto último indica una correcta extracción del ARN y que la molécula se encuentra óptima para continuar con el siguiente paso del protocolo de síntesis de ADNc a partir de ARN.

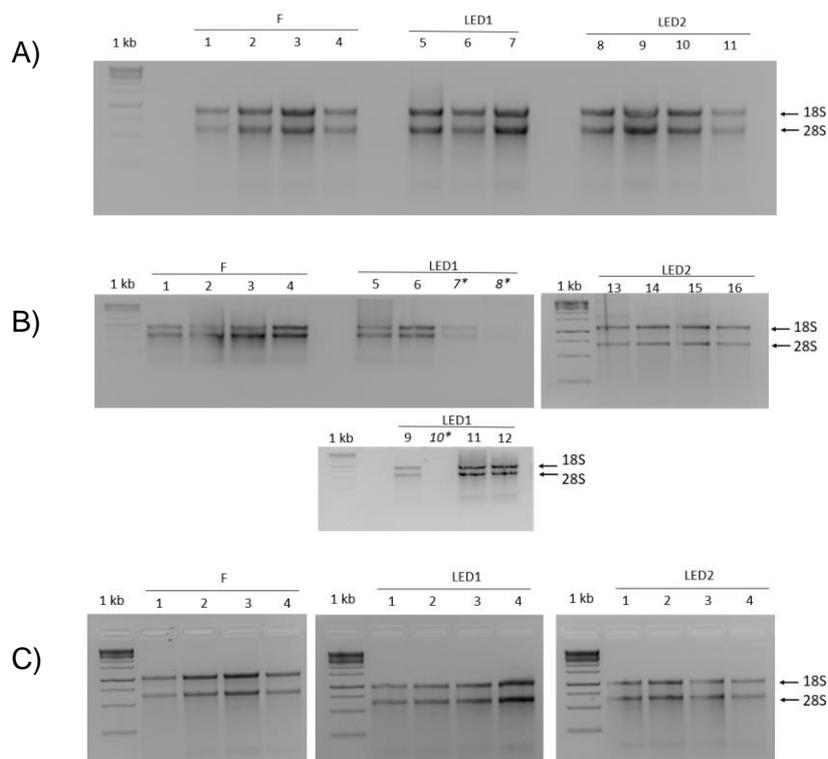


Figura 3. Integridad de muestras de ARN. Se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% la integridad del ARN extraído a partir de raíz de zanahoria a las **A)** 4 post-germinación (spg) en las condiciones F (carril 1-4), LED1 (carril 5-7) y LED2 (carril 8-11); **B)** 8 spg en las condiciones F (carril 1-4), LED1 (carril 5-12) y LED2 (carril 13-16); **C)** 12 spg en las condiciones F (carril 1-4), LED1 (carril 5-8) y LED2 (carril 9-12). Para cada muestra, se observa en el carril la presencia de dos bandas nítidas correspondientes al ARN ribosomal 18S y 28S, esto indica el estado óptimo del ARN. En A, B y C, 1kb corresponde al marcador de peso molecular utilizado. Las muestras acompañadas de un “*” no fueron utilizadas por mostrar baja cantidad de ARN o degradación. PG: postgerminación.

A continuación, se procedió con la eliminación de trazas de ADN genómico que pudiesen interferir con la amplificación de los genes durante el PCR en tiempo real (RT-qPCR). Para ello, a las muestras de ARN se les realizó un tratamiento con DNAsa I y luego se llevó a cabo un PCR de *Dcactina4*. En la figura 4 es posible observar los geles de agarosa que exhiben el resultado del PCR realizado. En este se observa para el control positivo c (+), la presencia de un amplicón de 900 pb, el cual corresponde a la amplificación del gen *Dcactina4* a partir de ADNg. En cambio, para cada carril correspondiente a las muestras de ARN extraídas y tratadas con DNAsaI, no se obtienen bandas de amplificación. Esto significa que en estas muestras no hay presencia de ADNg remanente que sirva como sustrato para la enzima polimerasa durante el PCR. De esta forma, la ausencia de un amplicón de 900 pb en las muestras demuestra la ausencia de trazas ADNg en las muestras de ARN y permite proceder con el protocolo de síntesis de ADNc.

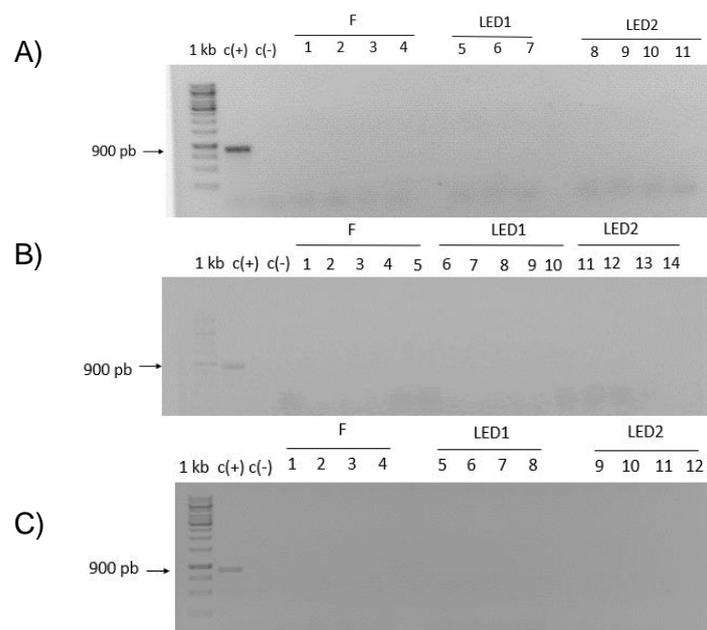


Figura 4. PCR de *Dcactina4* post-tratamiento DNAsa I. Se verificó la ausencia de trazas de ADN genómico en las muestras de ARN tratadas con DNAsa I. Se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% el resultado del PCR de *actina4* de las muestras de ARN extraído a partir de raíz de zanahoria a las **A)** 4 semanas post-germinación (spg) en las condiciones F (carril 1-4), LED1 (carril 5-7) y LED2 (carril 8-11); **B)** 8 spg en las condiciones F (carril 1-5), LED1 (carril 6-10) y LED2 (carril 11-14); **C)** 12 spg en las condiciones F (carril 1-4), LED1 (carril 5-8) y LED2 (carril 9-12). En A, B y C, 1kb corresponde al marcador de peso molecular utilizado; (C+) corresponde al control positivo, se utilizó ADN genómico de hojas de zanahoria y (C-) corresponde al control negativo, se añadieron todos los componentes de la reacción en ausencia de ARN. El fragmento de aproximadamente 900 pb corresponde a la amplificación del gen de *actina4*.

Con la evidencia de que el ARN no se encontraba degradado y la ausencia de ADNg, se procedió con el protocolo de síntesis de ADNc, y luego, se realizó un PCR de *Dactina4* a las muestras y se observó su resultado mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 5). En la figura 5, se observa que para cada una de las muestras correspondientes a 4, 8 y 12 semanas post-germinación, se obtuvo un amplicón de aproximadamente 695 pb, este corresponde a la amplificación del gen de *Dactina4* a partir de ADNc. La diferencia de pares de bases respecto al control positivo c(+) (900 pb) es debido a que la muestra control corresponde a ADNg, por lo que el largo del fragmento de *actina4* amplificado a partir de este templado considera la presencia de intrones. Por lo tanto, la diferencia de pares de bases de los fragmentos amplificados (Figura 5) permite verificar la correcta síntesis del ADNc para ser utilizado para llevar a cabo la reacción de RT-qPCR para los genes de interés seleccionados.

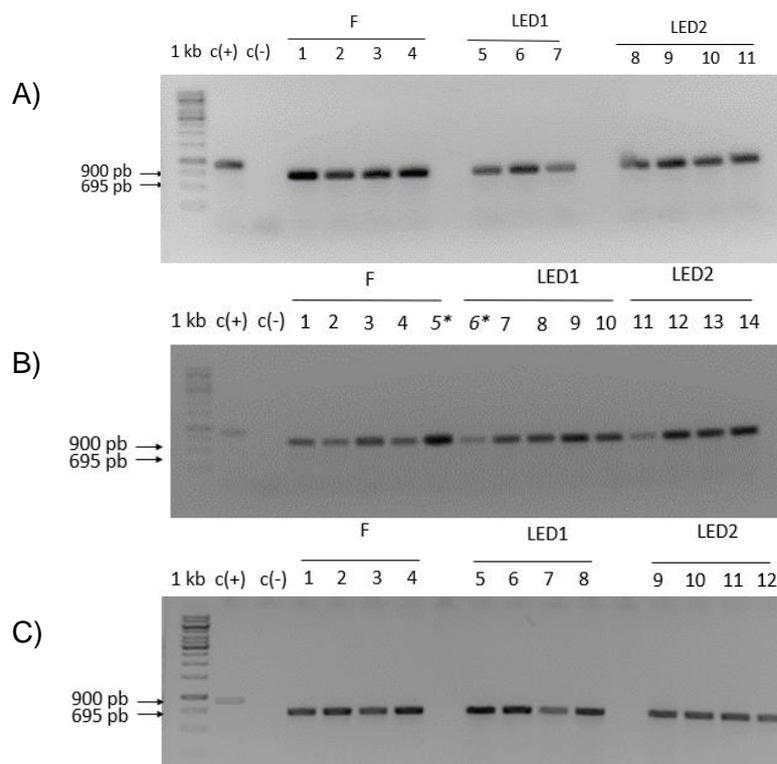


Figura 5. PCR de *Dactina4* a post-síntesis de ADNc. Se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% el resultado del PCR de *actina4* al ADNc de muestras correspondientes a **A)** 4 post-germinación (spg) en las condiciones F (carril 1-4), LED1 (carril 5-7) y LED2 (carril 8-11); **B)** 8 spg en las condiciones F (carril 1-5), LED1 (carril 6-10) y LED2 (carril 11-14); **C)** 12 spg en las condiciones F

(carril 1-4), LED1 (carril 5-8) y LED2 (carril 9-12). En A, B y C, 1kb corresponde al marcador de peso molecular utilizado; (C+) corresponde al control positivo, se utilizó ADN genómico de hojas de zanahoria y (C-) corresponde al control negativo, se añadieron todos los componentes de la reacción en ausencia de ADNc. El fragmento de aproximadamente 900 y 695 pb corresponde a la amplificación del gen *actina4* a partir de ADNg y ADNc, respectivamente. Las muestras acompañadas de un “**” no fueron utilizadas. PG: postgerminación.

Para determinar si las distintas condiciones lumínicas estarían produciendo diferencias a nivel de expresión génica, se determinó mediante qRT-PCR la abundancia relativa de transcritos correspondientes a siete genes en raíces de zanahoria de 4, 8 y 12 semanas post-germinación.

La selección de los genes de interés se basa en su funcionalidad y los resultados reportados por trabajos previos del grupo de investigación (Arias 2019; Arias et al., 2020). Los primeros dos genes a analizar corresponden a **DcPSY1** y **DcPSY2**, su selección se basa en que corresponden a genes clave en la ruta de biosíntesis de carotenoides (Fuentes et al., 2012). Por otro lado, la selección de los otros cinco genes a analizar se basa en un trabajo previo (Arias, 2019; Arias et al., 2020), en el cual se identificó que a las 8 semanas de crecimiento de la planta de zanahoria, estos cinco genes mostraban una mayor expresión relativa en la raíz de reserva que creció en oscuridad (R/O), respecto a la región que creció expuesta a luz (R/L; la cual se ve afectada por la luz directa y no se desarrolla como raíz de reserva). Tres de estos genes se clasifican bajo la categoría de participación en vías de la señalización por luz: **DcPHYA** y **DcPHYB**, corresponden a genes que codifican para los fitocromos A y B (Quián-Ulloa & Stange, 2021); y **DcPAR1**, el cual codifica para el factor transcripcional PHYTOCHROME REGULATED 1 (Zhou et al., 2014). Los otros dos genes se seleccionaron y se clasifican bajo la categoría de asociados al desarrollo, estos corresponden a **DcARF6** y **DcARC6**. El gen *ARF6*, codifica para un factor de transcripción que regula la expresión de genes de respuesta a la hormona auxina (Li et al., 2016), mientras que *ARC6* se asocia a la división y replicación del cloroplasto (Ma & Li, 2018).

De esta forma, considerando los criterios descritos anteriormente es que los resultados (Figura 6, 7 y 8) exhiben el nivel de expresión relativa en la raíz de zanahoria de tres categorías de genes: genes asociados a la síntesis de carotenoides (DcPSY1 y DcPSY2), genes involucrados en vías de señalización por luz (DcPHYA, DcPHYB y DcPAR1) y genes involucrados en desarrollo (DcARF6 y DcARC6) a las 4, 8 y 12 semanas post-germinación.

Es necesario señalar que en el caso de las 4 y 12 semanas se utilizó como gen de referencia *actina4*, mientras que a las 8 semanas se utilizó el de *ubiquitina*. Cabe mencionar que para cada una de las semanas de estudio se realizó el RT-qPCR para ambos genes y se escogió para la normalización aquel gen que su expresión en las tres condiciones tuviera un valor más cercano a 1. Por lo que en el caso de las 8 semanas, se utilizó *ubiquitina* ya que era el gen de referencia con la expresión relativa más homogénea (~1) en las raíces crecidas entre las condiciones lumínicas.

En el caso de las 4 semanas post-germinación (Figura 6), el análisis estadístico realizado indica que no existen diferencias significativas en la expresión de ninguno de los siete genes analizados, indicando así que a las 4 semanas ninguna de las tres condiciones lumínicas induciría una mayor expresión relativa de alguno de estos genes.

En cuanto a los resultados correspondientes a las 8 semanas post-germinación (Figura 7), se observa que para la categoría de genes involucrados en la síntesis de carotenoides, la condición LED1 induce una mayor expresión relativa de los genes *PSY1* y *PSY2*, respecto a F. A su vez, la condición LED2 induce una mayor expresión relativa solo de *DcPSY2* respecto a F. A pesar de que la expresión relativa de *PSY1* bajo la condición LED2 sea numéricamente mayor que la inducida bajo LED1, el análisis estadístico indica que no es significativo. Esto último puede deberse a la desviación estándar obtenida. Por otro lado, en la categoría de genes involucrados

en señalización por luz se observa que la condición LED2 induce una mayor expresión relativa de *PHYA*, *PHYB* y *PAR1* respecto a F. Particularmente, en el caso de *PHYA* la expresión relativa es también mayor respecto a LED1, pudiendo estar relacionado con la presencia del 14% de luz rojo lejano en la condición LED2. En la última categoría, correspondiente a genes de desarrollo, se observa que LED2 induce una mayor expresión relativa de *ARC6* frente a las condiciones F y LED1. Por su parte, el gen *ARF6* no presenta diferencias significativas.

Finalmente, a las 12 semanas post-germinación (Figura 8), se observa que para todos los genes de las categorías analizadas, no existen diferencias significativas en el nivel de expresión génica relativa entre las raíces desarrolladas bajo las condiciones lumínicas. Por lo que al igual que a las 4 semanas post-germinación, ninguna de las tres condiciones lumínicas induciría una mayor expresión relativa de alguno de estos genes.

De esta forma, resulta interesante que las diferencias en la expresión relativa ocurren a las 8 semanas, el cual ha sido descrito en la literatura como un tiempo clave para el desarrollo de la raíz de reserva de *D. carota*, ya que bajo condiciones de luces F es cuando se comienzan a observar características del desarrollo secundario de la raíz (Fuentes., 2012). En el caso de este trabajo, para este tiempo de crecimiento las condiciones experimentales LED1 y LED2 inducen la expresión de los genes de interés descritos con precisión anteriormente. Es particularmente interesante que aquellos genes carotenogénicos (*DcPSY1* y *DcPSY2*) se encuentran inducidos bajos las condiciones LED.

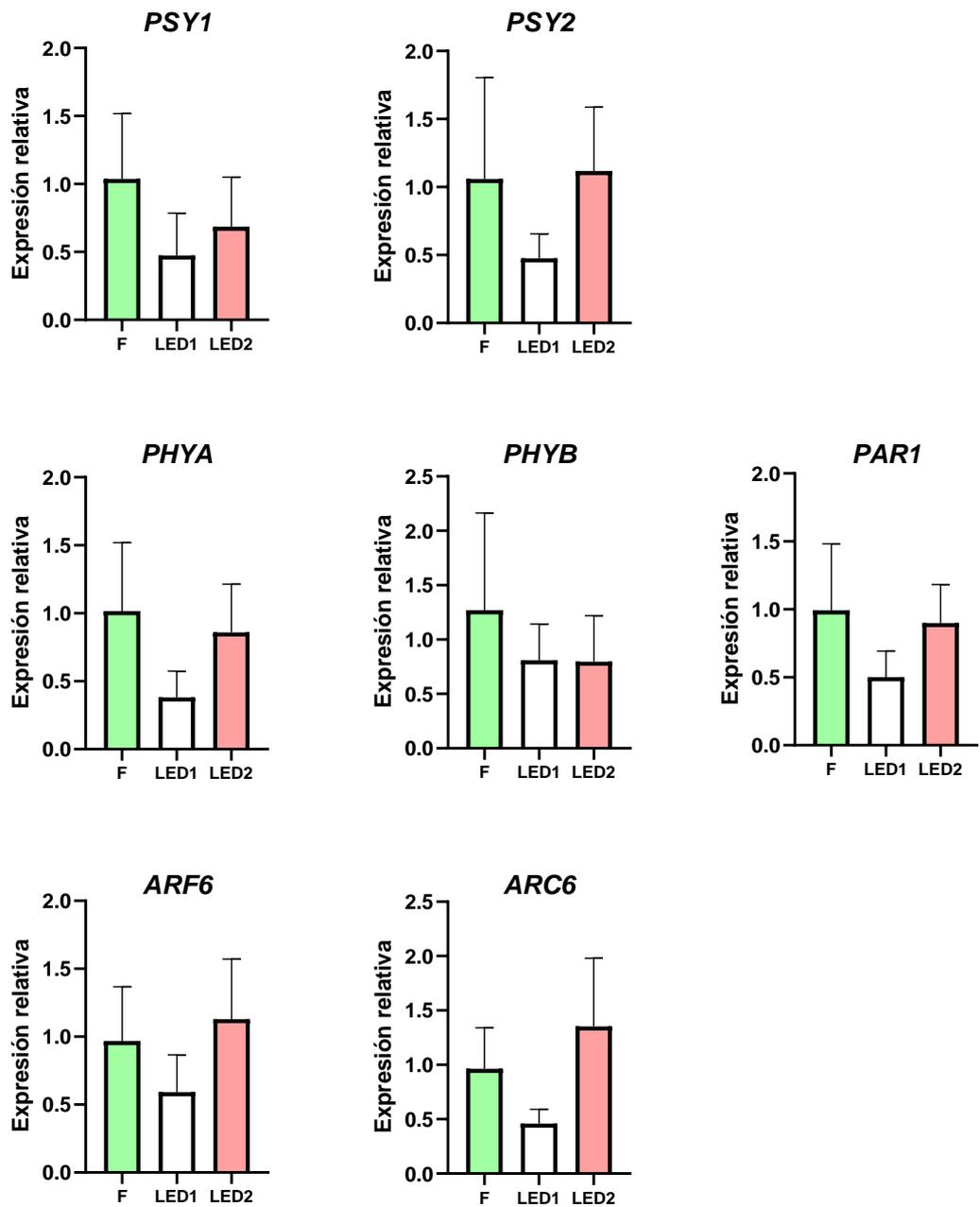


Figura 6. Niveles de expresión relativa de genes de interés en raíz de zanahoria de 4 semanas. Para el análisis se consideró como tratamiento control la condición F. La normalización se realizó respecto al gen actina4. No se hallaron diferencias significativas entre las condiciones mediante la prueba t de Student ($p < 0,05$) con corrección de Welch ($n=4$).

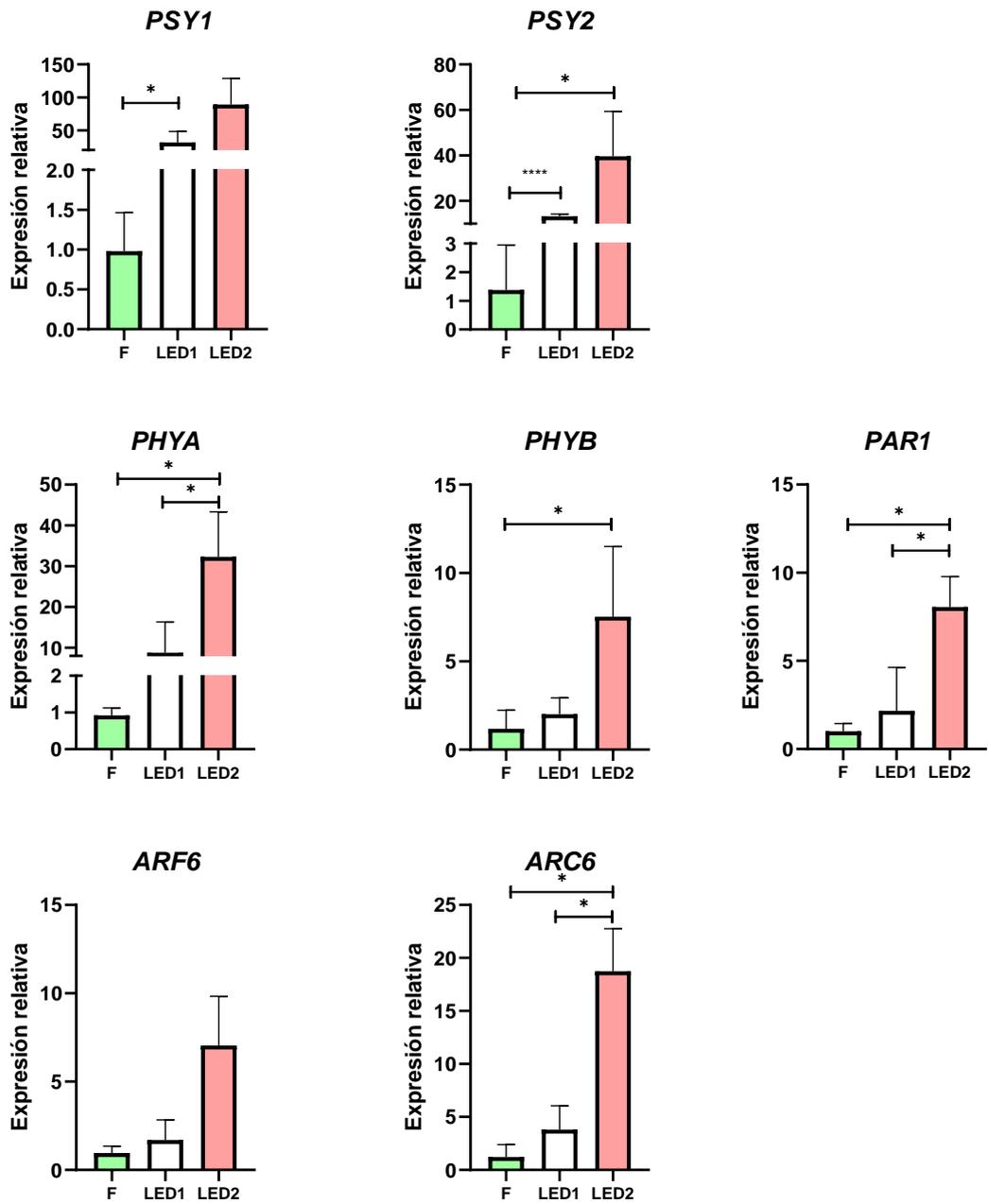


Figura 7. Niveles de expresión relativa de genes de interés en raíz de zanahoria de 8 semanas. Para el análisis se consideró como tratamiento control la condición F. La normalización se realizó respecto al gen ubiquitina. Las diferencias fueron calculadas mediante la prueba t de Student ($p < 0,05$) con corrección de Welch, respectivamente ($n=4$) **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.1$

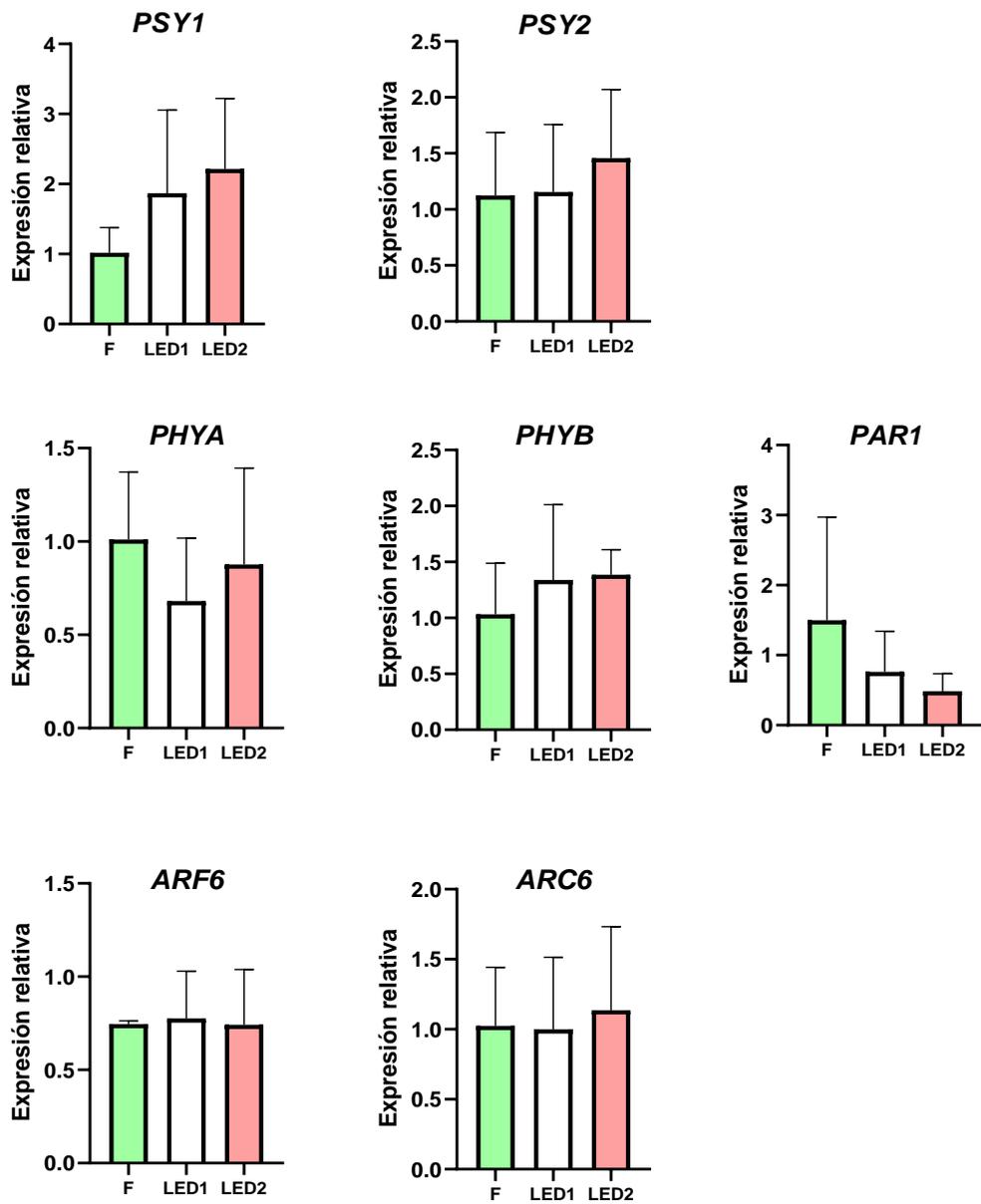


Figura 8. Niveles de expresión relativa de genes de interés en raíz de zanahoria de 12 semanas. Para el análisis se consideró como tratamiento control la condición F. La normalización se realizó respecto al gen actina4. No se hallaron diferencias significativas entre las condiciones mediante la prueba t de Student ($p < 0,05$) con corrección de Welch ($n=4$).

3.3 Analizar el efecto de las luces F, LED1 y LED2 sobre el fenotipo y nivel de pigmentos fotosintéticos en hojas y raíz de reserva de zanahoria en distintas etapas de desarrollo.

Para cumplir con este último objetivo, se procedió a recolectar datos para dilucidar los efectos que podrían llegar a tener las luces sobre el fenotipo de la raíz y el contenido de pigmentos en hoja y raíz. Una vez alcanzadas las 4, 8 y 12 semanas de crecimiento post-germinación en las condiciones lumínicas F, LED1 y LED2, se realizó la recolección de tejido aéreo y de raíz de las plantas para cuantificar el contenido de carotenoides totales y de clorofila (considerado como la suma entre la clorofila a y b). Se consideró conocer el contenido de fotopigmentos en hojas, ya que estos pueden entregar información respecto al efecto de las luces sobre la salud de la planta (Carter & Spiering, 2002) y bajo la observación era apreciable que las hojas de las plantas que crecían bajo LED2 perdían una mayor cantidad de hojas.

Por otro lado, para el entendimiento de los resultados de este objetivo, hay que considerar que para una mejor comprensión del análisis estadístico de los gráficos (Figura 9-13), en estos se presentan dos análisis estadísticos. Para el primer análisis estadístico (prueba ANOVA), las diferencias se denotan por letras, estas comparan una única condición lumínica a las 4, 8 y 12 semanas. En cambio, el segundo análisis (prueba T de student) se denota por “*”, asteriscos” y compara las tres condiciones lumínicas (F, LED1 y LED2) a un determinado número de semanas post-germinación. Es importante señalar que en caso de no presentar “*”, asteriscos” es debido a la ausencia de diferencias significativas.

Respecto al contenido de carotenoides en la raíz de zanahoria, se observa que a través de las semanas bajo la condición F, la raíz posee un aumento gradual del contenido de pigmento, mientras que en las condiciones experimentales LED1 y

LED2 el contenido de carotenoides aumenta al doble entre las 8 y 12 semanas (Figura 9) de crecimiento post-germinación. Por otro lado, si se compara el contenido de carotenoides de la raíz entre las tres condiciones para cada una de las semanas analizadas, no se observan diferencias significativas (Figura 9). Por lo tanto, ninguna de las condiciones experimentales estaría induciendo una mayor acumulación de carotenoides en la raíz.

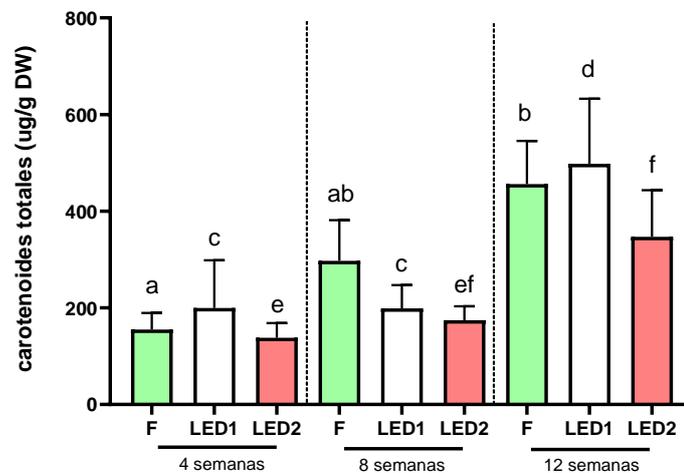


Figura 9. Contenido de carotenoides totales en raíz de zanahoria crecidas bajo las condiciones F, LED 1 y LED 2 a las 4, 8 y 12 semanas post germinación. Las letras denotan diferencias significativas para una condición a través del tiempo y los asteriscos denotan diferencias significativas entre las condiciones a un determinado número de semanas. Las diferencias fueron calculadas mediante ANOVA de una vía ($p < 0,05$) con corrección de Brown-Forsythe y Welch y mediante la prueba t de Student ($p < 0,05$) con corrección de Welch, respectivamente ($n=4$) **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.1$.

Por otro lado a nivel de tejido fotosintético, se cuantificó el contenido de carotenoides en las hojas de las plantas de zanahorias crecidas en las tres condiciones de luz estudiadas (Figura 10). Durante el desarrollo se observa que las plantas crecidas en las condiciones F y LED1 poseen un contenido de carotenoides sin diferencias significativas en el tiempo, esto coincide con lo observado por Fuentes et al., (2012). Por el contrario, en las hojas de las plantas crecidas en LED2 demuestran un contenido de carotenoides que varía en el tiempo. Además, en estas se observa un contenido de carotenoides menor a las 4 semanas respecto a las hojas de plantas

crecidas en F y LED1, pudiendo relacionarse con la observación de pérdida de hojas. Cabe mencionar que las hojas de las plantas que crecieron bajo LED2, presentaron su mayor contenido de carotenoides a las 8 semanas, el cual no presenta diferencias con el contenido de pigmentos presente en las hojas de las plantas crecidas en F y LED1 (Figura 10).

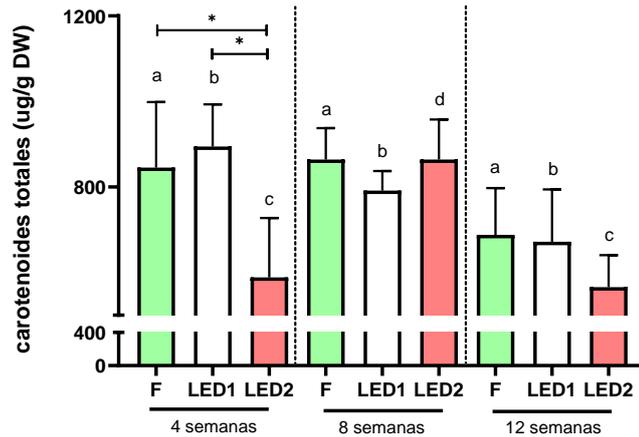


Figura 10. Contenido de carotenoides totales en hojas de zanahoria crecidas bajo las condiciones F, LED 1 y LED 2 a las 4, 8 y 12 semanas post germinación. Las letras denotan diferencias significativas para una condición a través del tiempo y los asteriscos denotan diferencias significativas entre las condiciones a un determinado número de semanas. Las diferencias fueron calculadas mediante ANOVA de una vía ($p < 0,05$) con corrección de Brown-Forsythe y Welch y mediante la prueba t de Student ($p < 0,05$) con corrección de Welch, respectivamente ($n=4$) **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.1$.

Además de carotenoides, se determinó el contenido de clorofila en hojas mediante la misma medición de cuantificación de carotenoides, específicamente se informa el contenido de clorofila, entendiéndose como la suma entre la clorofila a y clorofila b en las hojas (Figura 11). En las plantas crecidas en la condición LED2 se observó que a las 4 y 12 semanas de crecimiento el contenido de clorofila fue significativamente menor respecto a las plantas crecidas en condiciones F y LED1 (Figura 11). A su vez, a las 8 semanas el contenido de las hojas crecidas bajo LED2 es menor respecto a las hojas crecidas en la condición F. Cabe mencionar que a las 8 semanas la condición F es la que presenta una mayor acumulación de clorofilas respecto a LED1 y LED2.

Considerando la acumulación de carotenoides y clorofila en hojas de zanahoria (Figura 10 y 11), es apreciable una tendencia en donde la condición LED2 produce una menor acumulación de ambos ftopigmentos en hojas. Cabe mencionar, que las hojas de las plantas que crecían bajo LED2 presentaron la adquisición de tonalidades moradas (Figura S3, B).

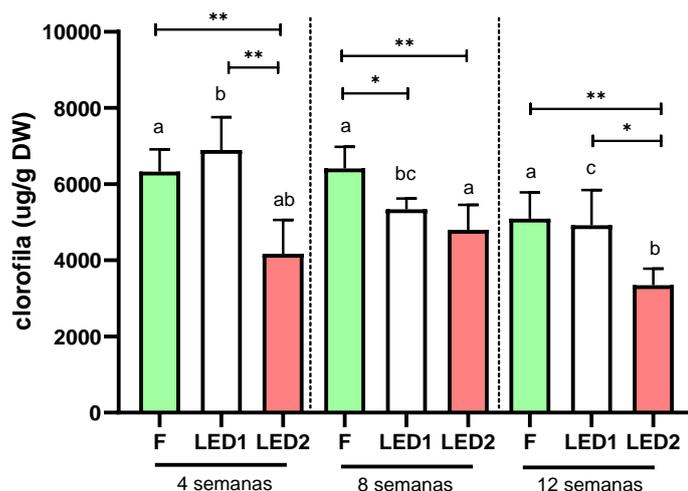


Figura 11. Contenido de clorofila a y b en hojas de zanahoria crecidas bajo las condiciones F, LED 1 y LED 2 a las 4, 8 y 12 semanas post germinación. Las letras denotan diferencias significativas para una condición a través del tiempo y los asteriscos denotan diferencias significativas entre las condiciones a un determinado número de semanas. Las diferencias fueron calculadas mediante ANOVA de una vía ($p < 0,05$) con corrección de Brown-Forsythe y Welch y mediante la prueba t de Student ($p < 0,05$) con corrección de Welch, respectivamente ($n=4$) **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.1$.

Para continuar con las actividades relativas al objetivo, se procedió a evaluar el efecto que tendrían las luces sobre el fenotipo de las raíces de las plantas en estudio, para las cuales se determinó el peso fresco (Figura 12) y diámetro (Figura 13).

Se determinó, de forma individual, el peso fresco de 10 raíces por cada condición de luz. Se observó que el peso fresco de las raíces aumentaba significativamente a través del tiempo independiente de las condiciones de crecimiento de las plantas (Figura 12). Sin embargo, las raíces desarrolladas bajo la condición F presentan un menor peso fresco respecto a las raíces de las plantas crecidas bajo LED1 y LED2 para cada una de las semanas analizadas (4, 8 y 12 semanas). Dicha diferencia

significativa es exacerbada a las 12 semanas, en donde cuantitativamente las raíces que crecieron bajo las condiciones LED1 y LED2 presentan 3.7 y 2.2 veces más masa que las raíces crecidas en la condición F, respectivamente. Entre las condiciones experimentales, se observa que solo hay diferencias significativas a las 4 semanas, donde las raíces de las plantas crecidas en LED2 alcanzan una mayor masa que las raíces crecidas en LED1, sin embargo, a las 8 y 12 semanas no hay diferencias significativas en el peso de fresco las raíces que crecieron bajo condiciones de luz LED. De esta forma, a las 4, 8 y 12 semanas, ambas condiciones experimentales inducen el crecimiento de raíces con un mayor peso fresco respecto a las raíces de la condición control.

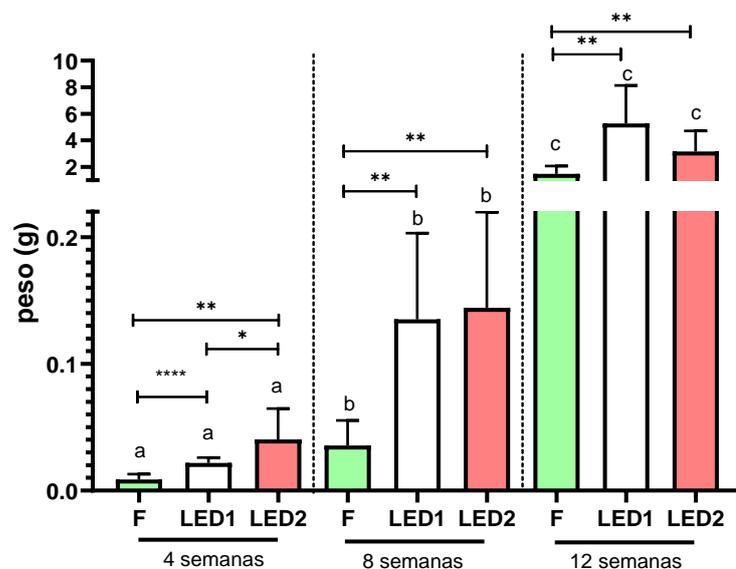


Figura 12. Peso fresco de raíces de zanahoria crecidas bajo las condiciones F, LED 1 y LED 2 a las 4, 8 y 12 semanas post germinación. Las letras denotan diferencias significativas para una condición a través del tiempo y los asteriscos denotan diferencias significativas entre las condiciones a un determinado número de semanas. Las diferencias fueron calculadas mediante ANOVA de una vía ($p < 0,05$) con corrección de Brown-Forsythe y Welch y mediante la prueba t de Student ($p < 0,05$) con corrección de Welch, respectivamente ($n=10$) **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.1$. Eliminación de datos atípicos mediante el método de ROUT ($Q=1\%$).

Otro de los parámetros fenotípicos analizados corresponde al diámetro de la raíz a las 8 y 12 semanas (Figura 13). Para ello, se realizó un corte transversal en la sección más gruesa de cada raíz, teniendo en total 10 cortes transversales por condición

lumínica, representando así el diámetro de 10 raíces distintas por condición de luz. Cabe mencionar que no se cuantificó el diámetro alcanzado por las raíces a las 4 semanas, ya que las raíces de las plantas crecidas en las tres condiciones no alcanzaban un estado de desarrollo apropiado (ausencia de desarrollo secundario) para la medición mediante el software utilizado (ImageJ). En el gráfico (Figura 13, A), se observa que tanto a las 8, como a las 12 semanas, aquellas raíces crecidas en las condiciones experimentales LED1 y LED2 presentan un diámetro significativamente mayor respecto a las raíces crecidas en la condición F. Entre las condiciones experimentales, se observa que a las 8 semanas existe una diferencia entre los diámetros de las raíces crecidas en LED1 y LED2, donde la condición LED1 induce el crecimiento de raíces con un mayor diámetro. Sin embargo, a las 12 semanas no hay diferencias estadísticas entre los diámetros de las raíces crecidas en las condiciones experimentales (Figura 13).

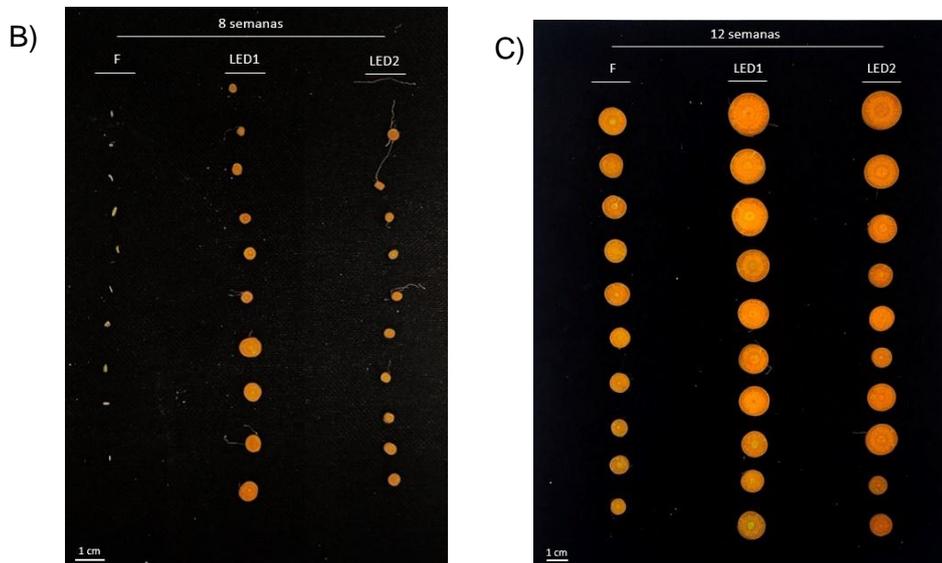
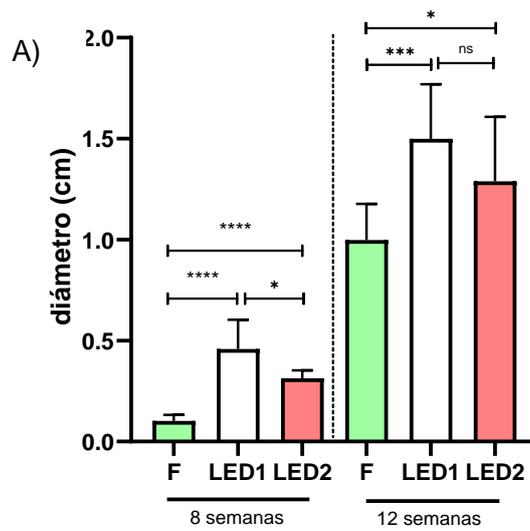


Figura 13. Diámetro de raíces de zanahoria bajo las condiciones F, LED 1 y LED 2 a las 4, 8 y 12 semanas post germinación. (A) Los asteriscos denotan diferencias significativas entre las condiciones a un determinado número de semanas. Las diferencias fueron calculadas mediante la prueba t de Student ($p < 0,05$) con corrección de Welch, respectivamente ($n=10$) **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.1$; (B) y (C) La barra de escala representa 1 cm. En cada condición lumínica se crecieron 10 plantas de zanahoria. Cada disco corresponde a la zona central de una raíz individual.

Respecto al mismo parámetro fenotípico, los paneles B y C de la Figura 13 corresponden a las imágenes mediante las cuales se obtuvieron las mediciones de diámetro de las raíces y con las cuales se construyó el gráfico del panel A de la misma figura. Estas imágenes dan cuenta de las diferencias en el estado de desarrollo secundario de las raíces. En términos generales, el desarrollo de la raíz se puede

dividir en dos: desarrollo primario y desarrollo secundario. El primero se caracteriza por la elongación de la raíz, mientras que el segundo se evidencia mediante el engrosamiento radial de éste órgano (Strock & Lynch, 2020), desencadenando la formación de la raíz de reserva, y que en el caso de la zanahoria le permite acumular carotenoides (Rosas-Saavedra & Stange, 2016). En este trabajo, mediante el aumento del diámetro de la raíz es observable que las raíces que crecieron bajo la condición LED1 y LED2 (Figura 13, B) han alcanzado un estado avanzado de desarrollo secundario de la raíz de zanahoria, produciendo raíces maduras antes de las 12 semanas post-germinación. A diferencia de aquellas raíces correspondientes a la condición control F, en donde a las 8 semanas no se observa un engrosamiento notable de la raíz, indicando que no han alcanzado un estado significativo de desarrollo secundario de este órgano. Recién a las 12 semanas, se observa el engrosamiento del disco central de las raíces que crecieron bajo la condición F (Figura 13, C), este evento coincide con lo reportado en la literatura (Fuentes et al., 2012).

Con el objetivo de apreciar las diferencias fenotípicas de la raíz completa desarrollada bajo las tres condiciones lumínicas se construyó la figura 14. En ésta se observan 4 raíces por condición lumínica a las 8 y 12 semanas (Figura 14, A y B, respectivamente) escogidas de forma aleatoria. A las 8 semanas, se da cuenta del estado de desarrollo secundario alcanzado por las raíces que crecieron bajo las condiciones LED1 y LED2, donde presentan un engrosamiento de la raíz y se observa una evidente coloración anaranjada dado la acumulación de carotenoides en la raíz de reserva (Figura 14, A). De esta forma, las raíces que crecen bajo las condiciones LED alcanzan un estado de madurez a las 8 semanas. Sin embargo, las raíces desarrolladas bajo la condición F presentan un fenotipo delgado respecto a las desarrolladas bajo las condiciones LED (Figura 14, A), coincidiendo con las imágenes de diámetro (Figura 13, B y C).



Figura 14. Comparación fenotípica entre raíces de zanahoria de 8 (A) y 12 (B) semanas en la condición F, LED1 y LED2. La barra de escala representa 1 cm. En cada condición lumínica se observan 4 raíces de zanahoria.

A diferencia de lo descrito anteriormente para las 8 semanas, se observa que a las 12 semanas (Figura 14, B) las diferencias fenotípicas disminuyen. Esto se fundamenta en que, se observa que existe una diferencia en el tamaño de las raíces, donde las cuatro raíces de la condición control F presentan un menor tamaño, sin embargo, las 12 raíces (4 de la condición F, 4 de la condición LED1 y 4 de la condición LED2) han alcanzado un estado avanzado de desarrollo secundario. De esta forma, las raíces que crecieron bajo la condición lumínica F alcanzan la madurez recién a las 12 semanas, coincidiendo con lo reportado en la literatura (Fuentes., 2012).

Considerando el peso fresco (Figura 12) y el diámetro de las raíces (Figura 13), es notable que las condiciones experimentales (LED1 y LED2) inducen el desarrollo secundario de la raíz, siendo éste observable a las 8 semanas (Figura 14, A). A diferencia de las raíces que crecieron bajo la condición F, en las cuales se alcanza un estado de desarrollo equiparable recién a las 12 semanas (Figura 14, B).

4. Discusión

Los resultados expuestos conducen a preguntarse ¿Cómo las raíces de *D. carota* - que no están en contacto directo con la condición lumínica suministrada- pueden percibir la luz para luego modificar su morfología y su maquinaria molecular? Si la luz es percibida directamente en las hojas (que corresponde al tejido fotosintético de la planta), ¿Cómo ello se traduce en un mayor tamaño radicular, pero no así en un mayor contenido de carotenoides?

Para el presente trabajo es necesario considerar que las condiciones de luz utilizadas difieren en los dos componentes cuantificados: intensidad y calidad, por lo que para establecer una relación del efecto de las luces sobre el desarrollo de *D. carota* es necesario considerar el conjunto de las componentes de cada condición de luz. En Kusuma et al., (2020) se hace mención de que para estudiar el efecto de la calidad del espectro de luz sobre las plantas, hay que considerar la sinergia entre las longitudes de onda que conforman el espectro, la intensidad lumínica y que este efecto varía entre las especies.

4.1 Efecto de las condiciones lumínicas sobre el tejido aéreo

Gonzalez-Calquin (2021, datos sin publicar) observó que la condición lumínica LED2 induce una mayor elongación del tallo respecto de las plantas crecidas en la condición control F a las 4 y 8 semanas (Figura S1). Dicha observación es coherente con las características del espectro que describe LED2 (AP67, Valoya), el cual es ofrecido en el mercado para potenciar el crecimiento vegetativo, y el cual posee el mayor nivel de PFD ($165,2 \text{ umol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), mayor porcentaje de luz roja (55%) y menor R/RL (3.92) de las condiciones (Tabla I).

Ante estos antecedentes, surge la pregunta ¿Qué podría estar induciendo la elongación de la parte aérea a las 8 semanas? Para ello hay que considerar las características espectrales de LED2, la cual posee un mayor porcentaje de rojo lejano (RL) (14%) y un menor porcentaje de luz azul (A) (11%), ambos factores podrían estar propiciando la mayor elongación de la parte aérea (Figura S1), debido a su participación en la respuesta al síndrome de huida de la sombra (SAS) (Wang et al., 2020) y la inhibición de la expansión celular (Dougher & Bugbee, 2004), respectivamente. El SAS corresponde al conjunto de respuestas que posee la planta frente a condiciones de sombra, la cual se caracteriza por una baja proporción de luz roja respecto a rojo lejano (bajo R/RL). Ésta condición de sombra puede ser configurada en invernaderos mediante la variación de la luz roja y rojo lejano, sin embargo, en la naturaleza suele encontrarse en condiciones de alta densidad vegetativa, dado que la clorofila presente en el tejido fotosintético absorbe la luz roja y azul eficientemente, transmitiendo selectivamente la luz rojo-lejana (Wang et al., 2020; Quian-Ulloa & Stange, 2021). Como respuesta a las condiciones de sombra, la planta busca la luz para superar la condición de sombra, lo cual conlleva respuestas como la elongación de tallo, adelantamiento de la floración, el aumento de la superficie foliar, entre otras (Sng et al., 2020; Tan et al., 2022). En el caso de la condición LED2, esta describe una razón R/RL (3.92) menor a F (5.65) y LED1 (5.04) (Tabla 1), siendo estos últimos similares entre sí. Cabe mencionar que, la elongación de la parte aérea de las plantas que crecieron bajo las condiciones F y LED1 no presentaron diferencias (Figura S1), lo cual lo podríamos asociar a que poseen una proporción R/RL similar. Dicho esto es que cobra valor sugerir que la inducción en la elongación del tallo guarde relación con la presencia de la luz rojo lejano en la condición LED2 (14%, Tabla I). Los valores de sombra simulada reportada en la literatura corresponden a R/RL: 0.2-0.7 (Sng et al., 2020; Wang et al., 2020), por lo que no podríamos determinar que LED2 se encuentra en condiciones de sombra, sin

embargo, sí presenta un mayor contenido de RL respecto a las condiciones LED1 y F. Se ha reportado que en respuesta a la baja proporción R/RL, o bien, el aumento de luz rojo lejano se produce una elongación del tallo (Cao et al., 2018; Izzo et al., 2020; Tan et al., 2022; Warnasooriya & Montgomery, 2011; Zhang et al., 2019). Específicamente, en *S. Lycopersicum*, se ha observado que la suplementación con luces LED que emiten fotones en el rango de la luz rojo lejano propicia la elongación del tallo, mientras que la luz azul antagónicamente, propicia la disminución del tamaño de la planta (Izzo et al., 2020; Zhang et al., 2019). Otro de los resultados que podrían sugerir el efecto de la luz RL en la condición LED2, corresponde al menor contenido de carotenoides en hojas a las 4 semanas (Figura 10) y un menor contenido de clorofila en las hojas a las 4, 8 y 12 semanas (Figura 11), características que se asemejan a condición de sombra (Casierra-Posada et al., 2012). Cabe mencionar que los bajos niveles de clorofila se mantienen en las hojas de las plantas crecidas en LED2 a las 4, 8 y 12 semanas, pudiendo demostrar que las plantas expuestas a una condición lumínica determinada demuestran adaptarse a ésta (Casierra-Posada et al., 2012). En el caso de otras plantas como lechuga, se ha reportado que uno de los efectos de la luz RL sobre tejido fotosintético corresponde a la disminución de los fitoquímicos: clorofila, carotenoides y antocianinas (Li & Kubota, 2009), sin embargo, en este trabajo se presentaría un aumento en el contenido de antocianinas en las hojas de las plantas que crecieron bajo la condición LED2 (Figura S3), por lo que con los resultados no es posible atribuir la disminución en el contenido de los fotopigmentos y la elongación del tallo a una condición de sombra simulada, sin embargo, sí es posible sugerir que existe una componente de luz RL robusta que induce la elongación del tallo a las 4 y 8 semanas. Por lo tanto, considerando los antecedentes descritos respecto a la luz rojo lejano, es que en este trabajo se atribuye la mayor elongación del tallo a las 4 y 8 semanas, y la disminución

de fotopigmentos a la presencia de la componente luz RL, la cual se ve reflejada en una razón R/RL de 3.86.

Otro aspecto a evaluar en torno a los fotopigmentos en tejido fotosintético, es que el contenido de clorofila y carotenoides guarda relación con la salud de la planta (Carter & Spiering, 2002). Coincidentemente las plantas de zanahoria crecidas bajo LED2, además de un menor contenido de carotenoides (4 semanas, Figura 10) y clorofila (4, 8 y 12 semanas, Figura 11) en hojas, también adquirieron un tono morado debido a la acumulación de antocianinas (Figura S3). Cabe mencionar que las hojas de las plantas de zanahoria no se caracterizan por tener hojas con tonalidades moradas, ni acumular antocianinas en éstas. Esto último podría llegar a indicar que hay cierto nivel de estrés en la planta, ya que se ha reportado que las plantas acumulan antocianinas en respuesta a estrés (Kovinich et al., 2015) y que estos pigmentos tendrían un rol clave protegiendo a la planta de mediante su capacidad antioxidante (Al Murad et al., 2021; Cartea et al., 2011). Esto conduce a preguntarse si realmente la condición lumínica LED2 es la adecuada para la salud de la planta de zanahoria, pudiendo estar la planta regulando la síntesis de estos compuestos fenólicos para evitar daños producidos por estrés oxidativo (Roeber et al., 2021). A su vez este posible estrés, podría estar repercutiendo en las variaciones de clorofila y carotenoides observadas en las hojas de plantas crecidas bajo la condición LED2 (Figura 10 y 11), pudiendo relacionarse con la eliminación y adquisición de nuevas hojas producto del estrés (Figura S3, B).

Bajo los antecedentes descritos, es sugerible que la condición lumínica LED2 podría llegar a representar un factor de estrés para *D. carota*, lo que se traduce en la acumulación de antocianinas y un menor contenido de fotopigmentos respecto lo observado en las otras condiciones. Sin embargo, para aseverar que LED2 induce estrés en las plantas, se podría complementar la cuantificación de antocianinas

(Figura S3) con la medición de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD), la cual participa en la eliminación de especies reactivas de oxígeno.

En cuanto a las otras condiciones lumínicas y su efecto sobre el tejido aéreo, la condición LED1 emite una intensidad lumínica de $86.6 \text{ umol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, (esto es casi dos veces mayor que la condición F, pero menor que LED2) posee una proporción R/RL de 5.04, la cual es similar a la descrita por la condición F (R/RL: 5.65) (Tabla I). A su vez, el contenido de fotopigmentos es similar entre las condiciones LED1 y F. Esto ocurre a las 4, 8 y 12 semanas de desarrollo en el caso de los carotenoides (Figura 10) y clorofila (Figura 11) (a excepción de las 8 semanas donde las plantas que crecen en la condición F poseen en sus hojas un contenido mayor de clorofila estadísticamente significativo respecto a ambas condiciones experimentales). Además, no existen diferencias estadísticas en las mediciones de la elongación del tallo entre las plantas que crecieron bajo F y LED1 (Figura S1). Por lo tanto, a nivel de tejido aéreo no existen diferencias robustas en el efecto producido por las condiciones LED1 y F (control) sobre las plantas. Esto se vería relacionado con que, según lo informado por el fabricante, el espectro que describe LED1 (NS12, Valoya) corresponde a uno de luz LED blanca, las cuales corresponden a condiciones que propician positivamente el crecimiento de organismos vegetales debido a su similitud con las condiciones de iluminación natural y la abundancia de fotones en el rango PAR (Kusuma et al., 2020; Pattison et al., 2018). Por lo tanto, para el caso de la condición experimental LED1, se sugiere que en este caso es el factor de mayor intensidad lumínica, sumado a las características espectrales de la condición LED1 (en términos de *PAR*), propician las condiciones necesarias para el crecimiento adecuado de *D. carota*, sin hojas que presenten niveles significativos de antocianinas (Figura S3, A). Cabe recordar, que *D. carota* es una especie que no se caracteriza por la adquisición de tonalidades moradas (contenido de antocianinas) en sus hojas.

4.2 Efecto de las condiciones lumínicas sobre la raíz de *D. carota*.

4.2.1 Efecto a nivel del fenotipo de la raíz de reserva.

Los tratamientos experimentales inducen el crecimiento de raíces de reserva de mayor peso fresco y diámetro (Figura 12 y 13). Ante esto surge la pregunta ¿Por qué se estarían produciendo raíces de mayor tamaño si la luz se percibe en las hojas? Uno de los eventos que puede explicar dicho fenómeno guarda relación con la fotosíntesis que ocurre en el tejido fotosintético aéreo y uno de los productos fotosintéticos, la sacarosa. La fotosíntesis depende de varios elementos entre los cuales se encuentra la intensidad lumínica y la calidad de la luz (Cope et al., 2014). Se ha descrito que la tasa fotosintética (medida como la incorporación de moléculas de CO₂ por unidad de superficie en el tiempo) aumenta a medida que la intensidad lumínica aumenta hasta alcanzar el punto de saturación de luz, el cual está sujeto al límite propio de la especie vegetal y a la cantidad presente de los elementos descritos anteriormente (Pokhrel et al., 2017; Wareing et al., 1968; Figura S4). Por otro lado, la calidad de la luz guarda relación con la longitud de onda a la cual la clorofila absorbe energía, siendo en este caso fotones con una longitud de onda en los rangos comprendidos en el espectro de luz roja (R) (600-700 nm) y luz azul (A) (400-500 nm) (Figura S5). Los fotones provenientes de estos rangos de longitud de onda permiten la excitación de la clorofila, en donde los electrones suben a un estado de mayor energía, y luego, son cedidos para formar parte de la cadena de electrones fotosintética (Reol, 2014). En el caso de LED2 y LED1, ambas condiciones presentan una mayor intensidad de luz respecto al control (165.2, 86.6 y 54.4 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente, Tabla I); y presentan espectros enriquecidos en luz roja respecto al control (55%, 38% y 20%, respectivamente, Tabla I). Los elementos descritos serían favorables para la fotosíntesis y propiciarían una mayor tasa fotosintética, siendo uno

de los productos la sacarosa. La evidencia demuestra que ésta molécula puede actuar a nivel radicular como una molécula de señalización derivada de las hojas, desencadenando así la morfogénesis y desarrollo del sistema radical en *A. thaliana* (Kircher & Schopfer, 2012; Kutschera & Briggs, 2019; Van Gelderen et al., 2018). Se ha determinado que la comunicación parte aérea de la planta y raíz, es uno de los determinantes para la formación y desarrollo de raíces especializadas en la acumulación de nutrientes. Específicamente, el nivel de sacarosa transportada desde la parte aérea de la planta a la raíz a través del floema puede determinar la elongación y desarrollo secundario de las raíces (Kuznetsova et al., 2020). En el caso de los antecedentes determinados por Gonzalez-Calquin (2021, datos sin publicar), se observa que a las 8 semanas la mayor elongación de raíz es alcanzada por las plantas que crecen bajo las condiciones LED1 y LED2 (Figura S1). Además, LED1 y LED2 inducen el crecimiento de raíces con un mayor peso fresco y diámetro a las 8 y 12 semanas (Figura 12 y 13). Dado que una mayor biomasa suele estar relacionada a una mayor capacidad fotosintética (Ma et al., 2010; Zha & Liu, 2018) y las condiciones experimentales LED1 y LED2 sugieren tener una intensidad y calidad de luz (Tabla I) que en su sinergia promoverían una tasa fotosintética mayor respecto de F, es que los fenotipos de raíz obtenidos bajo las condiciones LED1 y LED2 (Figura 14) podrían ser el resultado de una mayor generación de azúcares (sacarosa) que son transportados a la raíz desde el tejido fotosintético a través del floema. Esto también ha sido propuesto en especies como el rábano, donde la mayor biomasa de raíz de almacenamiento alcanzada se relaciona con el efecto de la intensidad de la luz sobre la fotosíntesis (Zha & Liu, 2018). Sin embargo, en este trabajo para comprobar dicho argumento sería necesario medir la tasa fotosintética en las condiciones ensayadas y el contenido de sacarosa.

En relación con el fenotipo de raíz observado, es interesante observar que las condiciones de luz tienen un efecto más drástico sobre la raíz de la planta que en su tejido aéreo (Figura S1), especialmente a las 8 semanas (Figura 14, A), en donde se evidencian efectos en la elongación, peso fresco y diámetro (Figura S2, 12, 13). Esto podría ser similar a lo observado por Zha & Liu (2018), en donde un aumento en la intensidad de luz produce un aumento en la biomasa de tejido aéreo y de la raíz de almacenamiento en rábano, sin embargo, la raíz se ve notablemente más afectada (positivamente) que el tejido aéreo. Cabe mencionar que en el trabajo de este autor, se mantenían las características de la calidad de la luz iguales entre las condiciones. Por otro lado, en el caso de este trabajo, los antecedentes que dan cuenta del efecto sobre la raíz corresponden a las diferencias en el diámetro y peso fresco de este órgano a las 8 y 12 semanas de desarrollo (Figura 12 y 13), en cambio, la elongación de las raíces presenta un promedio similar entre las condiciones a las 12 semanas (Figura S2). Por lo tanto, la mayor masa alcanzada en las raíces de las plantas crecidas bajo las condiciones LED1 y LED2 se atribuiría al mayor engrosamiento (diámetro, Figura 13) y no a la elongación de este órgano. Esto es coincidente con los resultados reportados por Hall (1990) en rábano, donde el aumento en la masa de la raíz se debía al aumento en el diámetro de ésta.

Otra de las razones por las cuales se podría estar viendo afectado positivamente el desarrollo de la raíz es debido a la composición del espectro de las condiciones LED1 y LED2 (Tabla I). En rábano se observó un efecto positivo en el desarrollo de la raíz (en términos de los parámetros diámetro, volumen y peso fresco) dependiente de la calidad de luz, específicamente de las proporciones de luz roja (R) respecto a luz azul (A), donde una proporción 2R:1A propiciaba el desarrollo de la raíz respecto a 1R:1A (Zha & Liu, 2018). Cabe mencionar que para comparar dichas proporciones, el autor mantuvo la misma intensidad de luz. En el caso de este trabajo diferían las

intensidades, aun así la composición en el rango del rojo y del azul en las condiciones lumínicas poseen los siguientes porcentajes: F posee un 20% R y 29% A, LED1 posee un 38% R y 18% A, mientras que LED2 posee un 55% R y 11% A. Esto determina para F, LED1 y LED2 proporciones R:A de 2:3, 2:1 y 5:1, respectivamente. Coincidentemente con lo reportado en rábano, en este trabajo cuando existe una mayor proporción de rojo respecto a azul en las condiciones experimentales, aumentan los parámetros diámetro y peso fresco (Figura 12 y 13) de la raíz en *D. carota*. Sin embargo, esto no quiere decir que mientras más luz roja más se potenciará el efecto. Esto se ve reflejado en que no existen diferencias significativas entre el peso fresco y diámetro alcanzado por las raíces que crecieron bajo LED1 y LED2 a las 12 semanas. Sin embargo, a las 8 semanas, se observa que las raíces desarrolladas bajo la condición LED1 (R:A de 2:1) poseen mayor diámetro respecto a LED2 (R:A de 5:1). Por lo que considerando los antecedentes reportados en rábano y los resultados obtenidos en este trabajo, mantener la proporción R:A de 2:1 (descrita por LED1), sería un elemento que favorecería un mayor desarrollo de la raíz de *D. carota*.

Los resultados descritos permiten sugerir que el fenotipo de raíces observados bajo las condiciones LED1 y LED2 se debe a un efecto propiciado por la sinergia de una calidad espectral adecuada (enriquecida principalmente en luz R) y una intensidad de luz mayor a la proporcionada por la luz control fluorescente.

4.2.2 Genes involucrados en vías de señalización por luz

Existe evidencia de que la luz percibida en hojas es capaz de generar efectos en las raíces. Durante la fotomorfogénesis, proceso que corresponde al conjunto de eventos morfológicos y de desarrollo de las plantas inducidos por la luz, (Lee et al., 2017), se

observa también el desarrollo del sistema radical. En cambio, en ausencia de luz, las plantas (etioladas) presentan un fenotipo alargado, blanquecino y con un sistema radicular no desarrollado (H. J. Lee et al., 2017; Quian-Ulloa & Stange, 2021). De tal forma, la percepción de luz en el tejido aéreo es esencial para que exista un desarrollo apropiado de la raíz bajo tierra. Diversos trabajos exponen evidencia respecto a que las raíces también sufren un proceso fotomorfogénico ya sea por incidencia directa o indirecta de la luz, dando lugar al concepto de *fotomorfogénesis radicular* (Kutschera & Briggs, 2019; Lee et al., 2017; Yokawa et al., 2013). Para explicar cómo las raíces perciben la luz se barajan tres hipótesis: 1) Mediante el movimiento de moléculas de señalización (factores de transcripción, hormonas) desde el tejido aéreo a la raíz (Chen et al., 2016; Ha et al., 2018; Tanimoto, 2005; Zhang et al., 2019). 2) A partir de la luz percibida en hojas, una fracción enriquecida en luz RL, se transmitiría a través del tallo, llegaría a las raíces y sería sensada por los fotorreceptores presentes en raíces (Lee et al., 2016; Sun et al., 2005). 3) Existiría un porcentaje de luz que puede penetrar el sustrato en el que se cultiva la planta de forma tal que las raíces podrían percibir de forma directa la luz sin que sea transmitida a través del tallo (Mo et al., 2015).

Independiente de cómo se esté mediando la respuesta en la raíz (en relación a las tres hipótesis descritas con anterioridad), es necesaria la participación de los fotorreceptores que sensan la luz. Entre ellos se encuentran los fitocromos (PHYs), los cuales son capaces de absorber luz en el rango del rojo (R) y del rojo lejano (RL), lo cual desencadena la activación o desactivación de la proteína permitiendo regular procesos como la fotomorfogénesis, el desarrollo de cloroplastos y la síntesis de fotopigmentos en respuesta a la calidad de la luz (Quian-Ulloa & Stange, 2021). En *A. thaliana* existe evidencia del rol de PHYA y PHYB sobre el desarrollo de la raíz. Se ha observado una disminución en la elongación de la raíz en mutantes *phyA* y *phyB* (Correll & Kiss, 2005; Salisbury et al., 2007; Silva-Navas et al., 2015). Por otro

lado, el grupo de Lee et al., (2016) proponen que la llegada de luz RL a la raíz activaría a PHYB, promoviendo la acumulación de HY5 (*ELONGATED HYPOCOTYL 5*), el cual corresponde a un factor de transcripción clave en la fotomorfogénesis que al estabilizarse promueve el crecimiento de la raíz en respuesta a luz. A nivel génico, ambos genes, *PHYA* y *PHYB* son genes fotoregulados (Cantón & Quail, 1999). Al analizar la regulación de la expresión de genes *PHY* en *A. thaliana* en función de la calidad de la luz (LED), se determinó que existe una fuerte inducción en las líneas p*PHYA*-LUC y p*PHYB*-LUC bajo luz rojo lejano (RL) sujeto a la acción de otro fitocromo, PHYE (Shapulatov et al., 2021). Por otro lado, Arias., et al (2020) sugirió la participación de ambos genes (*DcPHYA* y *DcPHYB*) en el desarrollo de la raíz de reserva de zanahoria, en base a que estos se expresaban en mayor medida en la raíz que lograba alcanzar el desarrollo secundario.

En las condiciones lumínicas estudiadas, a las 8 semanas post-germinación (momento en que comienza el desarrollo y síntesis de carotenoides en la raíz), la expresión relativa de *PHYA* (Figura 7) es significativamente mayor en la condición LED1 y LED2 respecto a F. Y la expresión de *PHYB* en la raíz se ve inducida en LED2 respecto a LED1 y F. Considerando que la transcripción de los genes *PHY* es uno de los determinantes del pool de proteína PHY disponible (Shapulatov et al., 2021), además del rol positivo de *PHYA* y *PHYB* sobre el desarrollo de la raíz, es posible sugerir que en este trabajo la inducción de ambos genes se vería relacionado con la inducción del desarrollo de raíz de reserva (Figura 12-14; Figura S2) en las plantas de zanahoria que crecen bajo las condiciones lumínicas LED1 y LED2, las cuales poseen mayor componente RL (Tabla I). Sin embargo, para ello habría que contemplar la abundancia a nivel de proteína. Bajo la suposición de que existe una fracción de luz RL que llega a la raíz (Lee et al., 2016), es posible que las diferencias en la expresión de *PHYA* y *PHYB* en las distintas condiciones luz viene dada por las variaciones de R y RL. A pesar de ello, recientemente se determinó que el

silenciamiento del gen *DcPHYA* en zanahoria muestra que es necesario para acumulación de carotenoides y expresión del gen *PSY1* en la raíz de reserva, aunque no afecta significativamente el desarrollo de ésta (Quián 2022, datos sin publicar).

Otro de los genes analizados en la categoría de señalización por luz es *PAR1*. Este corresponde a un cofactor transcripcional, que posee un rol clave en el SAS en *A. thaliana* (Zhou et al., 2014). Arias et al., (2022), le atribuyó un rol clave en la regulación del desarrollo y la síntesis de carotenoides en la raíz de reserva *D. carota*, en donde plantas a las que se les silenció el gen *PAR1* no desarrollaron la raíz de reserva característica de la zanahoria, permaneciendo significativamente una raíz más delgada y pálida en comparación a la planta control wild type (WT). En este trabajo se determinó que a las 8 semanas de desarrollo en las condiciones de crecimiento LED2 se induce una mayor expresión de *PAR1* en las raíces (Figura 7). Esta correlación podría apoyar el rol de *PAR1* en el desarrollo de la raíz, ya que fenotípicamente (Figura 14) se observa una raíz en un estado de desarrollo secundario avanzado a las 8 semanas en las condiciones LED2. Sin embargo, las raíces que crecieron bajo LED1 poseen un estado de desarrollo equiparable a aquellas que crecieron bajo LED2, y no presentan una inducción del gen *DcPAR1*.

4.2.3 Genes asociados a desarrollo

ARC6 (*accumulation and replication of chloroplast-6*) participa en el proceso de división del cloroplasto, lo cual determina el número de cloroplastos en la célula y posee un rol en la expansión y división celular (Ma & Li, 2018). Se ha determinado que la maquinaria utilizada por los cloroplastos para su división puede también ser utilizada por los cromoplastos para su división, específicamente, el elemento *ARC3*.

(*accumulation and replication of chloroplast-3*) (Sun et al., 2020, 2022). *ARF6* (*Auxin response factor 6*), corresponde a un factor de transcripción que regula la expresión de genes de respuesta auxina (Li et al., 2016). Este es expresado en raíces de *A. thaliana* y se le ha asignado un rol positivo en la formación de raíces adventicias. Se ha observado que es regulado positivamente por luz blanca y por luces monocromáticas azules, rojas y rojo lejano (Gutierrez et al., 2009). Por otro lado, para ambos genes, Arias et al., (2020) determinó que se encuentran más expresados en raíz crecida en oscuridad (R/O) que en raíz crecida en luz (R/L) a las 8 semanas de desarrollo, sugiriendo su participación en el desarrollo de la raíz de *D. carota*. En este trabajo, de estos genes solo *ARC6* presenta una mayor expresión a las 8 semanas bajo la condición LED2 (Figura 7) coincidiendo con el mayor tamaño de la raíz en dicho estadio (Figura 14, A). Al mismo tiempo, el tamaño de la raíz en LED2 es equiparable a la raíz en LED1, sin embargo, ésta última condición no induce la expresión de *ARC6*, por lo tanto en este trabajo no podemos sugerir su rol en la inducción del desarrollo secundario de la raíz de reserva de *D. carota*. Respecto a *ARF6*, a pesar de que ya que se ha reportado que la luz RL puede regular positivamente la expresión de un gen reportero, comandado por el promotor de *ARF6* (Gutierrez et al., 2009), en este trabajo ninguna de las condiciones LED (con un mayor porcentaje de luz RL respecto al control, Tabla I) induce significativamente la expresión de este gen en las raíces (Figura 7). Por lo que tampoco es posible sugerir el rol de *ARF6* en el desarrollo de la raíz de reserva bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo.

4.2.4 Adelantamiento del desarrollo secundario de la raíz de reserva de *D. carota*

Bao-xing et al., (2019), suplementó con luces LED azules y rojas (por separado) plantas de tomate en período de anthesis, para luego analizar los frutos de tomate. Éste buscaba establecer si existía un aceleramiento en el desarrollo del fruto producto de las luces LED, y determinó que los frutos que crecían bajo luces LEDs alcanzaban el “breaker stage” (etapa en la cual el fruto comienza a adquirir tonalidades de la gama del amarillo-rojo, debido a la acumulación de carotenoides) y la madurez antes que aquellos frutos bajo condición control (luz natural). Esto representa un antecedente de que las condiciones lumínicas proporcionadas por luces LED son capaces de adelantar la madurez, en este caso de un fruto.

Para fundamentar lo observado en zanahoria es necesario considerar que el desarrollo secundario en raíz corresponde a un proceso en el cual los meristemas secundarios laterales (cámbium vascular y felógeno) se encuentran en constante división y diferenciación celular, logrando la producción de tejido vascular secundario (xilema secundario y floema secundario) y la peridermis, lo que desencadena el aumento en el diámetro de la raíz (Strock & Lynch, 2020; Vanderschuren & Agusti, 2022), y por tanto, la formación de la raíz de reserva de *D. carota*. Ésta corresponde a un órgano vegetativo especializado en el almacenamiento de nutrientes, y en el caso específico de zanahoria, es la expansión del floema secundario el que permite el almacenamiento de los carotenoides (Kuznetsova et al., 2020). Además, tal como se ha mencionado en otras secciones, la sacarosa también corresponde a un elemento que determina la formación de la raíz de reserva. En esta especie se ha reportado que, bajo las condiciones proporcionadas por la condición de luz fluorescente, al mes de crecimiento la raíz presenta un fenotipo delgado y blanquecino. Sin embargo, debido al comienzo del desarrollo secundario, a las 8

semanas se hace visible un pequeño aumento en el grosor de la raíz y el comienzo de la adquisición del tono anaranjado debido a acumulación de carotenoides, alcanzado un estado de madurez recién a las 12 semanas (Arias, 2019; Arias et al., 2021; Fuentes et al., 2012; Simpson et al., 2016).

Resulta interesante observar que, es a las 8 semanas donde se aprecia las diferencias más notorias entre la condición control (F) y las experimentales (LED1 y LED2) a nivel fenotípico (Figura 14, A) y de expresión relativa de genes (Figura 7). A las 8 semanas, las características fenotípicas de las raíces permiten dar cuenta de la inducción del desarrollo secundario de este órgano en aquellas plantas que crecieron bajo LED1 y LED2. En este caso el engrosamiento de la raíz de reserva se ve reflejado en el mayor diámetro de raíz (Figura 13), lo cual se sustenta por la formación del tejido vascular secundario (floema) (Kuznetsova et al., 2020). A su vez, cuando se observan mayores diferencias fenotípicas, en términos del estado de desarrollo secundario alcanzado por las raíces, se observan diferencias en la expresión relativa de los genes de interés (Figura 7). Específicamente, en la categoría de genes asociados a la ruta de síntesis de carotenoides, *PSY1* se encuentra inducido por LED1, y *PSY2* inducido por LED1 y LED2. En la categoría de genes involucrados en señalización por luz, *PHYA*, *PHYB* y *PAR1* son inducidos por LED2; y LED1 induce la expresión de sólo *PHYA*. Y en la categoría de genes asociados a desarrollo, *ARC6* se ve inducido por LED1. Por lo tanto las condiciones LED1 y LED2 inducen la expresión de los genes descritos anteriormente, y a su vez (8 semanas post-germinación) ambas condiciones lumínicas inducen drásticamente el desarrollo secundario de la raíz de zanahoria, lo cual es evidenciado por el engrosamiento de la raíz. De esta forma, se producen raíces maduras antes de las 12 semanas post-germinación, y al cumplir las 12 semanas ya han alcanzado un tamaño superior respecto a las raíces que crecieron bajo la condición F (Figura 11-14), las cuales

recién alcanzaron un estado de desarrollo secundario notable a las 12 semanas post-germinación.

4.2.5 Disociación del desarrollo de la raíz y la acumulación de carotenoides en la raíz de reserva.

A pesar de la inducción del desarrollo secundario de la raíz de reserva de *D. carota* y la mayor expresión relativa de *DcPSY1* y *DcPSY2* a las 8 semanas (Figura 7), los tratamientos LED1 y LED2 no inducen una mayor acumulación de carotenoides en la raíz de reserva (Figura 8).

En la literatura se ha reportado que el silenciamiento de los genes *PAR1* y *LCYB1* (gen de síntesis de b-caroteno) en zanahorias conduce a la obtención de raíces pálidas con un menor grado de desarrollo y una menor acumulación de carotenoides (Arias et al., 2022; Moreno et al., 2013), demostrando una correlación entre desarrollo de la raíz y el contenido de carotenoides. De esta forma, es que ambos fenómenos demuestran ocurrir de forma paralela. A pesar de ello, en este trabajo se observa una inducción en el desarrollo secundario de la raíz de reserva a las 8 semanas, no así una inducción en el contenido de carotenoides, presentándose una disociación en la ocurrencia de ambos fenómenos. Esto conduce a la pregunta ¿Qué podría estar desencadenando la disociación de ambos fenómenos? ¿Por qué no existiría un aumento en el contenido de carotenoides? Para ello hay conocer los elementos que participan y determinan el contenido de carotenoides en la raíz de zanahoria. Los genes *PSY1* y *PSY2* codifican para las enzimas fitoeno sintasa, que son claves en la ruta de síntesis de carotenoides, ya que catalizan la primera reacción específica de la ruta (Rosas-Saavedra & Stange, 2016). En *D. carota* se ha reportado que *PSY1* se expresa en mayor medida en hojas proponiendo un rol en la síntesis de carotenoides en cloroplastos, mientras que *PSY2* se induce mayormente en raíz de

reserva donde existe mayor síntesis de carotenoides en los cromoplastos presentes en la raíz de reserva (Fuentes et al., 2012). En los antecedentes reportados con anterioridad, siempre se ha observado una correlación entre la abundancia relativa del transcrito de ambos genes y el contenido total de carotenoides (Arias et al., 2022; Flores-Ortiz et al., 2020; Moreno et al., 2013). Por ejemplo, al sobreexpresar un gen endógeno de síntesis de β -caroteno (*LCYB1*), en donde un aumento en la expresión de genes carotenogénicos, se encuentra en concordancia con un aumento en los niveles de carotenoides en la raíz de *D. carota* (Moreno et al., 2013). No obstante, en el presente trabajo un aumento en la expresión relativa de ambos genes (*DcPSY1* y *DcPSY2*) en las raíces de las plantas crecidas en LED1 y LED2 (8 semanas) no se traduce en el aumento del contenido de carotenoides respecto a las raíces de las plantas crecidas en la condición F (Figura 8). La ausencia de la inducción en el contenido de carotenoides puede explicarse si consideramos que la síntesis y acumulación de carotenoides depende de tres eventos: 1) la expresión de los genes carotenogénicos, 2) la estabilidad y actividad de las enzimas que participan en la ruta de biosíntesis y 3) el desarrollo de estructuras plastidiales para el almacenaje de los carotenoides (Llorente et al., 2017). Con los datos obtenidos es posible aseverar que se cumple el evento 1). Respecto a los eventos 2) y 3). Llorente et al., (2017) menciona que “la ultraestructura de los plastos no sólo afecta al perfil de carotenoides y a la capacidad de almacenamiento, sino que también puede influir en la capacidad biosintética modulando la actividad de la enzima PSY”. De esta forma, el estado de los eventos 2) y 3) pueden llegar a ser elementos determinantes que al no acompañar a la inducción de la expresión de los genes carotenogénicos, no se produciría un aumento del contenido de carotenoides. Se hipotetiza que LED1 y LED2 no reúnen las condiciones necesarias para que exista una inducción en el desarrollo de cromoplastos y/o una inducción en la actividad de PSY. Por consecuencia, no se evidenciaría un aumento del contenido de carotenoides totales. En este sentido,

podrían existir otros factores necesarios para aumentar el contenido de carotenoides que no son activados por las condiciones lumínicas LEDs. Un ejemplo de estos factores podría ser la chaperona OR (Orange), la cual actúa a nivel postraduccional y se ha descrito que estabiliza a PSY en *A. thaliana* (Zhou et al., 2015; Sun et al., 2018).

4.2.6 Proyecciones

En términos de investigación, dado que uno de los principales hallazgos de este trabajo corresponde a la inducción del desarrollo secundario de la raíz de reserva de *D. carota*, es que para la continuidad de esta investigación se debe considerar estudiar rasgos asociados a este fenómeno y preguntarse ¿Qué elementos estarían implicados en el desarrollo secundario de la raíz de reserva de *D. carota*? Entre las actividades se debe contemplar la observación bajo microscopia del tejido vascular secundario mediante cortes histológicos de la sección transversal de la raíz de reserva, para así identificar y comparar el cámbium y el floema secundario formado en las raíces de plantas que crecen bajo LED1, LED2 y F. Por otro lado, en dirección de conocer los elementos que se ven inducidos durante la formación de la raíz de reserva se propone la realización de un RNA-seq, lo que permitiría comparar el transcriptoma de las raíces que crecieron bajo luces LED respecto a las que crecieron bajo luz fluorescente. Específicamente, sería relevante estudiar elementos moleculares asociados a la diferenciación de las células meristemales del cámbium y la formación del floema secundario, tal como el factor de transcripción APL (*Altered floem development*), el cual regula la diferenciación del floema a nivel de raíces (Kuznetsova et al., 2020; Martin Bonke et al., 2003).

Un aspecto importante por considerar en futuros estudios del efecto de la luz corresponde a disminuir prácticas que pudiesen estar generando grandes desviaciones estándar. La desviación estándar corresponde a un indicador del grado de dispersión de los datos individuales en torno a la media (Streiner, 1996), mientras mayor sea la desviación, mayor es la dispersión de datos. Este parámetro, junto con el n de muestras, contribuyen a determinar si existen diferencias significativas entre las condiciones ensayadas, mediante la realización de pruebas estadísticas (t-student y ANOVA). De tal forma, en investigación, éstas estiman la probabilidad de que los resultados puedan haber surgido por azar, o bien, si existe una relación significativa entre una variable y el resultado obtenido (Carley & Lecky, 2003). En el caso de este trabajo, en alguno de los resultados existe una alta dispersión de los datos (barras de desviación estándar en los gráficos). Ejemplo de ello es en la Figura 7, particularmente en la expresión relativa de los genes *PSY1* y *ARF6*. En ambos casos se observa una clara tendencia a que la condición LED2 podría estar induciendo una diferencia significativa respecto a la condición control F, ya que la condición LED1, aun presentando una menor expresión relativa de este gen respecto a F, presenta diferencia significativa. Por otro lado, experimentalmente, cada bandeja contaba con un n de pocillos en donde se sembraron 4-5 semillas de zanahoria (por lo general germinaron 3-4), lo que puede estar produciendo efectos negativos no homogéneos sobre el tamaño de la raíz debido a una menor disponibilidad de espacio, y por ende, una mayor dispersión de los resultados. De hecho, en la Figura 14, a pesar de que se observa una tendencia notoria al mayor tamaño de raíz en las condiciones experimentales, se aprecian diferencias entre los fenotipos de raíz en una misma condición lumínica. Por su parte, esto da valor a la determinación de más de un parámetro fenotípico realizada en este trabajo. Se debiese considerar sembrar a lo más dos semillas por pocillo para descartar la dispersión de datos que se podría

dar producto de un efecto negativo sobre el crecimiento de la raíz de zanahoria en respuesta a menor disponibilidad de espacio.

Por otro lado, se propone que en un futuro estudio del efecto de las condiciones lumínicas se considere la variación de solo una de las componentes de la luz, de forma tal que las condiciones lumínicas posean al menos una componente homogénea entre sí. Esto permitiría establecer una relación más específica entre una componente y el efecto desencadenado en la raíz. Ejemplo de ello sería equiparar la intensidad de luz (PFD, $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) entre las condiciones para descartar la contribución de esta componente, y observar, mediante distintos porcentajes, el efecto propio de la contribución de fotones con una longitud de onda dentro de un rango de interés, o viceversa, manteniendo proporciones de calidad de luz homogéneas entre las condiciones lumínicas y variando la intensidad de luz.

En términos de proyección hacia la industria, cabe mencionar que entre los vegetales más consumidos a nivel mundial se encuentra la zanahoria. La FAO estima una producción mundial de 44,76 toneladas de zanahoria, lo que la posiciona como el sexto vegetal con mayor producción en el mundo (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2019). El alto nivel de producción está ligado a la relevancia de *D. carota* en la dieta, ya que corresponde a una importante fuente de provitamina A debido a su alto contenido de carotenoides, principalmente de α -caroteno y β -caroteno, constituyendo el 95% del total del contenido de carotenoides (Baranska et al., 2006). Dicho esto, es que es importante poder encontrar soluciones al cultivo eficiente de zanahoria, en términos de tiempo y volumen productivo. En el presente trabajo se demostró el aceleramiento del desarrollo de la raíz de reserva de *D. carota* mediante la implementación de luces LEDs, por lo que sería posible producir una mayor biomasa de raíz comestible de zanahoria en menores tiempos.

Actualmente en las ciudades se ha masificado la agricultura vertical en condiciones de luz artificial (LEDs), ésta corresponde a un sistema de producción de plantas en interior en el que factores como luz, humedad, nutrientes son controlados con precisión con el fin de producir en gran cantidad y calidad durante todo el año (SharathKumar et al., 2020), pudiendo ser desarrollada como cultivo hidropónico o en sustrato. La importancia de estos sistemas de cultivo radica en desligarse de la necesidad de explotar extensas áreas de suelo, posibilitar el traslado local de la agricultura a ciudades y el potencial productivo que presentan dado la posibilidad de configurar condiciones de luz específicas para potenciar el crecimiento de las especies cultivadas (Jones, 2018). Sin embargo, esto es aplicado comúnmente para el crecimiento de hojas verdes comestibles como lechuga, acelga, albahaca y no es posible encontrar la producción de vegetales de raíz comestible en la agricultura vertical. Los resultados de este trabajo permiten proyectar a *D. carota* como una especie de importancia nutricional que puede introducirse a este sistema de cultivo vertical bajo iluminación LED con grandes ventajas en términos del grado de desarrollo que logran las raíces en un menor tiempo (desarrollo secundario alcanzado a los 2 meses en vez de 3), además de la mantención de la calidad nutricional. Esto cobra relevancia cuando se ha demostrado que el contenido nutricional de la zanahoria se ve afectado negativamente por la temporada de cultivo (Perrin et al., 2016). Sin embargo, dado que este trabajo es de los primeros en evaluar el efecto de LEDs sobre zanahoria, es apropiado continuar los esfuerzos para optimizar las condiciones lumínicas en relación con los requerimientos específicos de *D. carota*, y así promover su proyección biotecnológica dentro de la agricultura vertical.

5. Conclusiones

Las condiciones lumínicas difieren en las componentes de intensidad y calidad de la luz, siendo de esta forma heterogéneas entre sí, por lo que se considera la sinergia de ambos parámetros para evaluar el efecto de las luces sobre la raíz de *D. carota*.

Las condiciones LED1 y LED2 generan un mayor desarrollo secundario de la raíz y aumentan la expresión de genes carotenogénicos (*DcPSY1* y *DcPSY2*) a las 8 semanas de crecimiento, sin embargo no se acompaña de un aumento en el contenido de carotenoides respecto a lo observado en F. Por efecto, queda en evidencia una disociación entre el desarrollo secundario y la acumulación de carotenoides en la raíz de *D. carota*. En este contexto, un mayor contenido de luz R y una mayor intensidad lumínica serían las características que favorecerían un mayor desarrollo secundario de la raíz de *D. carota*. Esto generaría una fotosíntesis más eficiente en hojas, lo que propiciaría un mayor flujo de sacarosa a la raíz, induciendo de esta forma el desarrollo secundario de la raíz de reserva de *D. carota*, y por tanto, la producción de raíces maduras antes de los 3 meses de crecimiento.

Se concluye que la sinergia de las componentes intensidad y calidad de la luz, hacen a LED1 la mejor condición lumínica para crecer a *D. carota* en ambientes de iluminación controlada, debido a que induce el desarrollo secundario de la raíz de reserva a las 8 semanas de crecimiento, mantiene los niveles de carotenoides en ésta, y que las hojas de las plantas que crecen bajo esta condición presentan niveles de pigmentos acorde a las características fenotípicas de *D. carota*.

6. Bibliografía

- Al Murad, M., Razi, K., Jeong, B. R., Samy, P. M. A., & Muneer, S. (2021). Light emitting diodes (Leds) as agricultural lighting: Impact and its potential on improving physiology, flowering, and secondary metabolites of crops. *Sustainability (Switzerland)*, *13*(4), 1–25. <https://doi.org/10.3390/su13041985>
- Arias, D. (2019). *Estudio del efecto de la luz sobre la acumulación de carotenoides en la raíz de reserva de Daucus carota*. 142.
- Arias, D., Arenas-M, A., Flores-Ortiz, C., Peirano, C., Handford, M., & Stange, C. (2021). *Daucus carota DcPSY2 and DcLCYB1 as Tools for Carotenoid Metabolic Engineering to Improve the Nutritional Value of Fruits*. *Frontiers in Plant Science*, *12*(August), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.677553>
- Arias, D., Gonza, C., Quiroz, L. F., Moreno-romero, J., & Mart, J. F. (2022). *Development and carotenoid synthesis in dark-grown carrot taproots require PHYTOCHROME RAPIDLY*. 1–16.
- Arias, D., Maldonado, J., Silva, H., & Stange, C. (2020). A de novo transcriptome analysis revealed that photomorphogenic genes are required for carotenoid synthesis in the dark-grown carrot taproot. *Molecular Genetics and Genomics*, *295*(6), 1379–1392. <https://doi.org/10.1007/s00438-020-01707-4>
- Bao-xing, X. I. E., Jing-jing, W. E. I., Yi-ting, Z., Shi-wei, S., Wei, S. U., Guang-wen, S. U. N., & Yan-wei, H. A. O. (2019). Supplemental blue and red light promote lycopene synthesis in tomato fruits. *Journal of Integrative Agriculture*, *18*(3), 590–598. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62062-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62062-3)
- Baranska, M., Baranski, R., Schulz, H., & Nothnagel, T. (2006). Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. *Planta*, *224*(5), 1028–1037. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0289-x>
- Bugbee, B. (2016). Toward an optimal spectral quality for plant growth and development: The importance of radiation capture. *Acta Horticulturae*, *1134*(Figure 1), 1–12. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1134.1>
- Cantón, F. R., & Quail, P. H. (1999). Both phyA and phyB mediate light-imposed repression of phyA gene expression in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *121*(4), 1207–1215. <https://doi.org/10.1104/pp.121.4.1207>
- Cao, K., Yu, J., Xu, D., Ai, K., Bao, E., & Zou, Z. (2018). *Exposure to lower red to far-red light ratios improve tomato tolerance to salt stress*. 10–15.
- Carley, S., & Lecky, F. (2003). Statistical consideration for research. *Emergency Medicine Journal*, *20*(3), 258–262. <https://doi.org/10.1136/emj.20.3.258>
- Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P., & Velasco, P. (2011). Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules*, *16*(1), 251–280. <https://doi.org/10.3390/molecules16010251>
- Carter, G. A., & Spiering, B. A. (2002). Optical Properties of Intact Leaves for Estimating Chlorophyll Concentration. *Journal of Environmental Quality*, *31*(5), 1424–1432. <https://doi.org/10.2134/jeq2002.1424>
- Casierra-Posada, F., Ávila-León, O., & Riascos-Ortíz, D. (2012). *Changes in Photosynthetic pigments content in sun and shae marigold leaves*.
- Chen, X., Yao, Q., Gao, X., Jiang, C., Harberd, N. P., & Fu, X. (2016). Shoot-to-Root Mobile Transcription Factor HY5 Coordinates Plant Carbon and Nitrogen Acquisition. *Current Biology*, *26*(5), 640–646. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.066>
- Cope, K. R., & Bugbee, B. (2013). Spectral effects of three types of white light-emitting diodes on plant growth and development: Absolute versus relative amounts of blue light. *HortScience*, *48*(4), 504–509. <https://doi.org/10.21273/hortsci.48.4.504>
- Cope, K. R., Snowden, M. C., & Bugbee, B. (2014). Photobiological interactions of

- blue light and photosynthetic photon flux: Effects of monochromatic and broad-spectrum light sources. *Photochemistry and Photobiology*, 90(3), 574–584. <https://doi.org/10.1111/php.12233>
- Correll, M. J., & Kiss, J. Z. (2005). The roles of phytochromes in elongation and gravitropism of roots. *Plant and Cell Physiology*, 46(2), 317–323. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci038>
- Dougher, T. A. O., & Bugbee, B. (2004). Long-term blue light effects on the histology of lettuce and soybean leaves and stems. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(4), 467–472. <https://doi.org/10.21273/jashs.129.4.0467>
- Doyle, J. ., & Doyle, J. . (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 19, 11–15.
- Flores-Ortiz, C., Alvarez, L. M., Undurraga, A., Arias, D., Durán, F., Wegener, G., & Stange, C. (2020). Differential role of the two ζ -carotene desaturase paralogs in carrot (*Daucus carota*): ZDS1 is a functional gene essential for plant development and carotenoid synthesis. *Plant Science*, 291(June 2019), 110327. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110327>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2019). *FAOSTAT statistical database*. [Rome].
- Fuentes, P., Pizarro, L., Moreno, J. C., Handford, M., Rodriguez-Concepcion, M., & Stange, C. (2012). Light-dependent changes in plastid differentiation influence carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant Molecular Biology*, 79(1–2), 47–59. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9893-2>
- Gutierrez, L., Bussell, J. D., Păcurar, D. I., Schwambach, J., Păcurar, M., & Bellini, C. (2009). Phenotypic plasticity of adventitious rooting in arabidopsis is controlled by complex regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR transcripts and microRNA abundance. *Plant Cell*, 21(10), 3119–3132. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064758>
- Ha, J., Kim, J., Kim, S., Sim, H., Lee, G., Halitschke, R., Baldwin, I. T., Kim, J., & Park, C. (2018). Shoot phytochrome B modulates reactive oxygen species homeostasis in roots via abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. 790–798. <https://doi.org/10.1111/tpj.13902>
- Hasan, M. M., Bashir, T., Ghosh, R., Lee, S. K., & Bae, H. (2017). An overview of LEDs' effects on the production of bioactive compounds and crop quality. *Molecules*, 22(9), 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules22091420>
- Heber, J. (2014). Nobel Prize 2014: Akasaki, Amano & Nakamura. *Nature Physics*, 10(11), 791–791. <https://doi.org/10.1038/nphys3147>
- Izzo, L. G., Hay Mele, B., Vitale, L., Vitale, E., & Arena, C. (2020). The role of monochromatic red and blue light in tomato early photomorphogenesis and photosynthetic traits. *Environmental and Experimental Botany*, 179(July), 104195. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104195>
- Johnson, M. P. (2016). Photosynthesis. *Essays in Biochemistry*, 60(3), 255–273. <https://doi.org/10.1042/EBC20160016>
- Jones, M. A. (2018). Using light to improve commercial value. *Horticulture Research*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0049-7>
- Kapulnik, Y., Delaux, P. M., Resnick, N., Mayzlish-Gati, E., Winer, S., Bhattacharya, C., Séjalon-Delmas, N., Combiér, J. P., Bécard, G., Belausov, E., Beeckman, T., Dor, E., Hershenhorn, J., & Koltai, H. (2011). Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in *Arabidopsis*. *Planta*, 233(1), 209–216. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1310-y>
- Kircher, S., & Schopfer, P. (2012). Photosynthetic sucrose acts as cotyledon-derived long-distance signal to control root growth during early seedling development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America*, 109(28), 11217–11221.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1203746109>
- Köhl, K., Tohge, T., & Schöttler, M. A. (2017). Performance of *Arabidopsis thaliana* under different light qualities: Comparison of light-emitting diodes to fluorescent lamp. *Functional Plant Biology*, 44(7), 727–738.
<https://doi.org/10.1071/FP17051>
- Kong, Y., & Nemali, K. (2021). *Blue and Far-Red Light Affect Area and Number of Individual Leaves to Influence Vegetative Growth and Pigment Synthesis in Lettuce*. 12(July), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.667407>
- Kovinich, N., Kayanja, G., Chanoca, A., Otegui, M. S., & Grotewold, E. (2015). Abiotic stresses induce different localizations of anthocyanins in *Arabidopsis*. *Plant Signaling and Behavior*, 10(7). <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1027850>
- Kusuma, P., & Bugbee, B. (2021). Far-red fraction: An improved metric for characterizing phytochrome effects on morphology. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 146(1), 3–13.
<https://doi.org/10.21273/JASHS05002-20>
- Kusuma, P., Pattison, P. M., & Bugbee, B. (2020). From physics to fixtures to food: current and potential LED efficacy. *Horticulture Research*, 7(1).
<https://doi.org/10.1038/s41438-020-0283-7>
- Kutschera, U., & Briggs, W. R. (2019). Photomorphogenesis of the root system in developing sunflower seedlings: a role for sucrose. *Plant Biology*, 21(4), 627–633. <https://doi.org/10.1111/plb.12981>
- Kuznetsova, K. A., Dodueva, I. E., Pautov, A. A., Krylova, E. G., & Lutova, L. A. (2020). Genetic Control of Storage Root Development. *Russian Journal of Plant Physiology*, 67(4), 589–605. <https://doi.org/10.1134/S102144372004010X>
- Lee, H., Ha, J., Kim, S., Choi, H., Kim, Z. H., Han, Y., Kim, J., Oh, Y., Fragoso, V., Shin, K., Hyeon, T., Choi, H., Oh, K., Baldwin, I. T., & Park, C. (2016). *Stem-piped light activates phytochrome B to trigger light responses in Arabidopsis thaliana roots*. 1–9.
- Lee, H. J., Park, Y. J., Ha, J. H., Baldwin, I. T., & Park, C. M. (2017). Multiple Routes of Light Signaling during Root Photomorphogenesis. *Trends in Plant Science*, 22(9), 803–812. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.06.009>
- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269–1278. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.5.1269>
- Li, Q., & Kubota, C. (2009). Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. *Environmental and Experimental Botany*, 67(1), 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.06.011>
- Li, S. B., Xie, Z. Z., Hu, C. G., & Zhang, J. Z. (2016). A review of auxin response factors (ARFs) in plants. *Frontiers in Plant Science*, 7(FEB2016), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00047>
- Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and Carotenoids Measurement and UV-VIS characterization Lichtenthaler 2001. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F4.3.1-F4.(Supplement 1), 1–8.
- Liu, J., & Iersel, M. W. Van. (2021). *Photosynthetic Physiology of Blue , Green , and Red Light: Light Intensity Effects and Underlying Mechanisms*. 12(March). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.619987>
- Llorente, B., Martinez-Garcia, J. F., Stange, C., & Rodriguez-Concepcion, M. (2017). Illuminating colors: regulation of carotenoid biosynthesis and accumulation by light. *Current Opinion in Plant Biology*, 37, 49–55.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.03.011>
- López, G., Álvarez-rivera, G., Carazzone, C., Ibáñez, E., Leidy, C., & Cifuentes, A.

- (2021). *Carotenoids in Bacteria : Biosynthesis , Extraction , Characterization and Applications*. August. <https://doi.org/10.20944/preprints202108.0383.v1>
- Ma, L., & Li, G. (2018). FAR1-RELATED SEQUENCE (FRS) AND FRS-RELATED FACTOR (FRF) family proteins in arabidopsis growth and development. *Frontiers in Plant Science*, 9(June), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00692>
- Ma, Z., Li, S., Zhang, M., Jiang, S., & Xiao, Y. (2010). Light intensity affects growth, photosynthetic capability, and total flavonoid accumulation of *Anoectochilus* plants. *HortScience*, 45(6), 863–867. <https://doi.org/10.21273/hortsci.45.6.863>
- Martin Bonke, Siripong Thitamadee, Ari Pekka Ma'ho'nen, Marie-Theres Hauser, & Yka Helariutta. (2003). APL regulates vascular tissue identity in Arabidopsis. *Nature*, 426(6963), 181–186. <https://doi.org/10.1038/nature02117.1>
- Martínez-García, J. F., & Monte, E. (2020). The International Symposium on Plant Photobiology 2019: a bright and colourful experience. *Physiologia Plantarum*, 169(3), 297–300. <https://doi.org/10.1111/ppl.13127>
- Matlock, B. (2015). Assessment of Nucleic Acid Purity. *Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers*, 1–2.
- Meng, Q., Kelly, N., & Runkle, E. S. (2019). Substituting green or far-red radiation for blue radiation induces shade avoidance and promotes growth in lettuce and kale. *Environmental and Experimental Botany*, 162, 383–391. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.03.016>
- Mérai, Z., Graeber, K., Wilhelmsson, P., Ullrich, K. K., Arshad, W., Grosche, C., Tarkowská, D., Turečková, V., Strnad, M., Rensing, S. A., Leubner-Metzger, G., & Scheid, O. M. (2019). *Aethionema arabicum*: A novel model plant to study the light control of seed germination. *Journal of Experimental Botany*, 70(12), 3313–3328. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz146>
- Mo, M., Yokawa, K., Wan, Y., & Baluska, F. (2015). How and why do root apices sense light under the soil surface? *Frontiers in Plant Science*, 6(September), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00775>
- Moreno, J. C., Pizarro, L., Fuentes, P., Handford, M., Cifuentes, V., & Stange, C. (2013). Levels of Lycopene β -Cyclase 1 Modulate Carotenoid Gene Expression and Accumulation in *Daucus carota*. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058144>
- Pattison, P. M., Tsao, J. Y., Brainard, G. C., & Bugbee, B. (2018). LEDs for photons, physiology and food. *Nature*, 563(7732), 493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0706-x>
- Perrin, F., Brahem, M., Dubois-Laurent, C., Huet, S., Jourdan, M., Geoffriau, E., Peltier, D., & Gagné, S. (2016). Differential Pigment Accumulation in Carrot Leaves and Roots during Two Growing Periods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(4), 906–912. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05308>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45e – 45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pokhrel, B., Sorensen, J. N., Kristensen, H. L., & Petersen, K. K. (2017). Nutrient availability, photosynthesis, and growth of parsley fertigated with chicken manure extract and lupin sap. *Canadian Journal of Plant Science*, 97(6), 1004–1013. <https://doi.org/10.1139/cjps-2017-0012>
- Quian-Ulloa, R., & Stange, C. (2021). Carotenoid biosynthesis and plastid development in plants: The role of light. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms22031184>
- Rahman, M. M., Field, D. L., Ahmed, S. M., Hasan, M. T., Basher, M. K., & Alameh, K. (2021). LED Illumination for High-Quality High-Yield Crop Growth in Protected Cropping Environments. *Plants*, 10(11), 2470.

- <https://doi.org/10.3390/plants10112470>
- Reol, E. (2014). Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz. *Asociación Española de Ecología Terrestre*, 12(1), 1–12. <http://www.aeet.org/ecosistemas/031/informe4.htm>
- Roeber, V. M., Bajaj, I., Rohde, M., Schmülling, T., & Cortleven, A. (2021). Light acts as a stressor and influences abiotic and biotic stress responses in plants. *Plant Cell and Environment*, 44(3), 645–664. <https://doi.org/10.1111/pce.13948>
- Rosas-Saavedra, C., & Stange, C. (2016). Biosynthesis of Carotenoids in Plants: Enzymes and Color. In *Sub-Cellular Biochemistry* (Vol. 79, pp. 35–69). https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_2
- Rosas, C. (2014). *Caracterización funcional del gen carotenogénico licopeno β -ciclase 2 (DcLcyb2) de Daucus carota (zanahoria) mediante expresión en sistemas heterólogos.*
- Ruyter-Spira, C., Al-Babili, S., van der Krol, S., & Bouwmeester, H. (2013). The biology of strigolactones. *Trends in Plant Science*, 18(2), 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.10.003>
- Sah, S. K., Reddy, K. R., & Li, J. (2016). *Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants*. 7(May), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00571>
- Salisbury, F. J., Hall, A., Grierson, C. S., & Halliday, K. J. (2007). Phytochrome coordinates Arabidopsis shoot and root development. *Plant Journal*, 50(3), 429–438. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03059.x>
- Sandmann, G. (2022). Carotenoids and Their Biosynthesis in Fungi. *Molecules*, 27(4), 1431. <https://doi.org/10.3390/molecules27041431>
- Shapulatov, U., Meisenburg, M., Hoogdalem, Mark van, Hall, A. van, Ieperen, W. Van, Wassenaar, M. van, & Krol, A. R. van der. (2021). Phytochrome gene expression studies: PHYE is required for FR-induced expression of PHYA and PHYD suppresses expression of PHYA. *BioRxiv*, 2021.06.20.449137. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.06.20.449137v1>
- SharathKumar, M., Heuvelink, E., & Marcelis, L. F. M. (2020). Vertical Farming: Moving from Genetic to Environmental Modification. *Trends in Plant Science*, 25(8), 724–727. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.05.012>
- Silva-Navas, J., Moreno-Risueno, M. A., Manzano, C., Pallero-Baena, M., Navarro-Neila, S., Téllez-Robledo, B., García-Mina, J. M., Baigorri, R., Gallego, F. J., & Del Pozo, J. C. (2015). D-Root: A system for cultivating plants with the roots in darkness or under different light conditions. *Plant Journal*, 84(1), 244–255. <https://doi.org/10.1111/tpj.12998>
- Simpson, K., Cerda, A., & Stange, C. (2016). Carotenoids in Nature: Carotenoid Biosynthesis in *Daucus carota*. *Carotenoids in Nature: Biosynthesis, Regulation, and Function*, 79, 377–414. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7>
- Sng, B. J. R., Singh, G. P., Van Vu, K., Chua, N. H., Ram, R. J., & Jang, I. C. (2020). Rapid metabolite response in leaf blade and petiole as a marker for shade avoidance syndrome. *Plant Methods*, 16(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00688-0>
- Spalding, E. P., & Folta, K. M. (2005). Illuminating topics in plant photobiology. *Plant, Cell and Environment*, 28(1), 39–53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01282.x>
- Streiner, D. L. (1996). Maintaining standards: Differences between the standard deviation and standard error, and when to use each. *Canadian Journal of Psychiatry*, 41(8), 498–502. <https://doi.org/10.1177/070674379604100805>
- Strock, C. F., & Lynch, J. P. (2020). Root secondary growth: an unexplored component of soil resource acquisition. *Annals of Botany*, 126(2), 205–218. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaa068>
- Sun, Q., Yoda, K., & Suzuki, H. (2005). *Internal axial light conduction in the stems*

- and roots of herbaceous plants. *56*(409), 191–203. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri019>
- Sun, T., Rao, S., Zhou, X., & Li, L. (2022). Plant carotenoids: recent advances and future perspectives. *Molecular Horticulture*, *2*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s43897-022-00023-2>
- Sun, T., Yuan, H., Chen, C., Kadirjan-Kalbach, D. K., Mazourek, M., Osteryoung, K. W., & Li, L. (2020). ORHis, a Natural Variant of OR, Specifically Interacts with Plastid Division Factor ARC3 to Regulate Chromoplast Number and Carotenoid Accumulation. *Molecular Plant*, *13*(6), 864–878. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.03.007>
- Swan, B. V., & Bugbee, B. (2018). Decreasing blue light increases growth of four diverse species © . *Acta Horticulturae*, *1212*, 261–262. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2018.1212.59>
- Takaichi, S. (2011). Carotenoids in algae: Distributions, biosyntheses and functions. *Marine Drugs*, *9*(6), 1101–1118. <https://doi.org/10.3390/md9061101>
- Tan, T., Li, S., Fan, Y., Wang, Z., Ali Raza, M., Shafiq, I., Wang, B., Wu, X., Yong, T., Wang, X., Wu, Y., Yang, F., & Yang, W. (2022). Far-red light: A regulator of plant morphology and photosynthetic capacity. *Crop Journal*, *10*(2), 300–309. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.06.007>
- Tanimoto, E. (2005). Regulation of root growth by plant hormones - Roles for auxin and gibberellin. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *24*(4), 249–265. <https://doi.org/10.1080/07352680500196108>
- Van Gelderen, K., Kang, C., & Pierik, R. (2018). Light signaling, root development, and plasticity. *Plant Physiology*, *176*(2), 1049–1060. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01079>
- Vanderschuren, H., & Agusti, J. (2022). Storage roots. *Current Biology*, *32*(12), R607–R609. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.03.034>
- Wang, X., Gao, X., Liu, Y., Fan, S., & Ma, Q. (2020). Progress of Research on the Regulatory Pathway of the Plant Shade-Avoidance Syndrome. *Frontiers in Plant Science*, *11*(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00439>
- Wareing, P. F., Khalifa, M. M., & Treharne, K. J. (1968). Rate-limiting processes in photosynthesis at saturating light intensities. *Nature*, *220*(5166), 453–457. <https://doi.org/10.1038/220453a0>
- Warnasooriya, S. N., & Montgomery, B. L. (2011). *Spatial-specific regulation of root development by phytochromes in Arabidopsis thaliana*. December, 2047–2050. <https://doi.org/10.4161/psb.6.12.18267>
- Yokawa, K., Kagenishi, T., & Baluška, F. Š. (2013). Root photomorphogenesis in laboratory-maintained Arabidopsis seedlings. *Trends in Plant Science*, *18*(3), 117–119. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.01.002>
- Yuan, H., Zhang, J., Nageswaran, D., & Li, L. (2015). Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops. *Horticulture Research*, *2*(July). <https://doi.org/10.1038/hortres.2015.36>
- Zha, L., & Liu, W. (2018). Effects of light quality, light intensity, and photoperiod on growth and yield of cherry radish grown under red plus blue LEDs. *Horticulture Environment and Biotechnology*, *59*(4), 511–518. <https://doi.org/10.1007/s13580-018-0048-5>
- ZHANG, Y. ting, ZHANG, Y. qi, YANG, Q. chang, & LI, T. (2019). Overhead supplemental far-red light stimulates tomato growth under intra-canopy lighting with LEDs. *Journal of Integrative Agriculture*, *18*(1), 62–69. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62130-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62130-6)
- Zhang, Y., Wang, C., Xu, H., Shi, X., Zhen, W., Hu, Z., Huang, J., Zheng, Y., Huang, P., Zhang, K. X., Xiao, X., Hao, X., Wang, X., Zhou, C., Wang, G., Li, C., & Zheng, L. (2019). HY5 Contributes to Light-Regulated Root System Architecture Under

- a Root-Covered Culture System. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01490>
- Zhen, S., & Bugbee, B. (2020). Far-red photons have equivalent efficiency to traditional photosynthetic photons: Implications for redefining photosynthetically active radiation. *Plant Cell and Environment*, 43(5), 1259–1272. <https://doi.org/10.1111/pce.13730>
- Zhen, S., van Iersel, M., & Bugbee, B. (2021). Why Far-Red Photons Should Be Included in the Definition of Photosynthetic Photons and the Measurement of Horticultural Fixture Efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 12(June), 10–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.693445>
- Zhou, P., Song, M., Yang, Q., Su, L., Hou, P., Guo, L., Zheng, X., Xi, Y., Meng, F., Xiao, Y., Yang, L., & Yang, J. (2014). Both PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED1 (PAR1) and PAR2 promote seedling photomorphogenesis in multiple light signaling pathways. *Plant Physiology*, 164(2), 841–852. <https://doi.org/10.1104/pp.113.227231>
- Zhou, X., Welsch, R., Yang, Y., Álvarez, D., Riediger, M., Yuan, H., Fish, T., Liu, J., Thannhauser, T. W., & Li, L. (2015). Arabidopsis OR proteins are the major posttranscriptional regulators of phytoene synthase in controlling carotenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(11), 3558–3563. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420831112>

7. Anexo

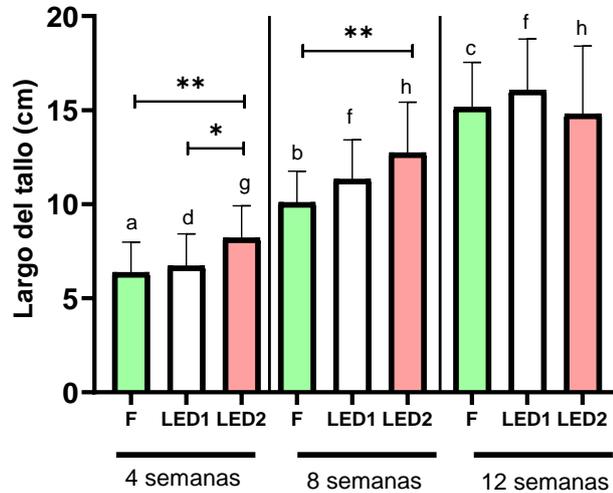


Figura S1. Elongación de la parte aérea. Las letras denotan diferencias significativas a lo largo del tiempo (F 4 semanas vs 8 semanas, etc) y los asteriscos denotan las diferencias significativas entre los tratamientos en un tiempo determinado (4 semanas F vs B vs B+R). Las diferencias fueron calculadas mediante ANOVA de una vía con corrección de Brown-Forsythe y Welch para comparaciones múltiples. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.1$. (Gonzalez-Calquin 2021, datos sin publicar).

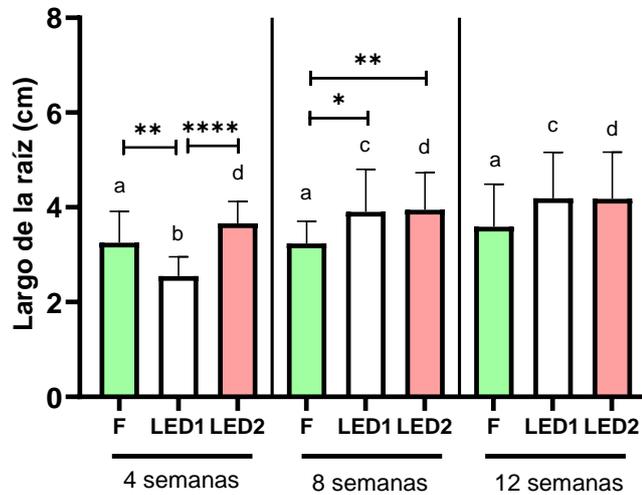


Figura S2. Elongación de la raíz de reserva. Las letras denotan diferencias significativas a lo largo del tiempo (F 4 semanas vs 8 semanas, etc) y los asteriscos denotan las diferencias significativas entre los tratamientos en un tiempo determinado (4 semanas F vs B vs B+R). Las diferencias fueron calculadas mediante ANOVA de una vía con corrección de Brown-Forsythe y Welch para comparaciones múltiples. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.1$. (Gonzalez-Calquin 2021, datos sin publicar)

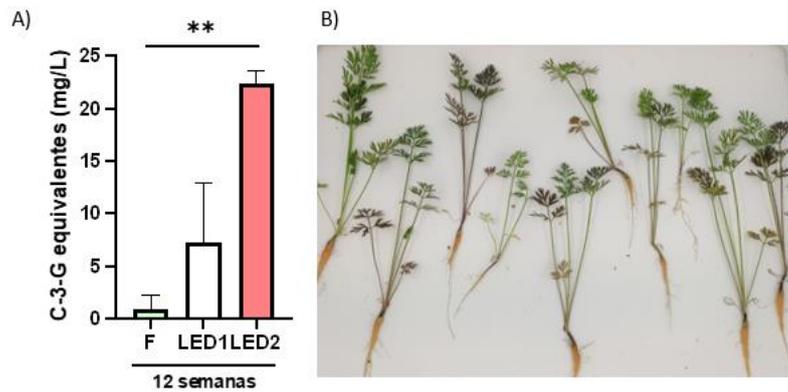


Figura S3. Acumulación de antocianinas en hojas de zanahoria en la condición F, LED1 y LED2. A) Contenido total de antocianina monomérica expresado en unidades de cianin-3-glucosa equivalentes (mg/mL) en hojas de zanahorias de 12 semanas. La cuantificación fue realizada mediante espectrofotometría utilizando el método de pH diferencial descrito por Lee et al., (2005) (2 réplicas biológicas) B) Registro fotográfico de zanahorias de 8 semanas en condición LED2. Se observa en las hojas la coloración morada correspondiente a la acumulación de antocianinas. (Registro fotográfico realizado por Gonzalez-Calquin (2021)). Bajo estos resultados y registro fotográfico, se observa que la condición LED2 induce la acumulación de antocianinas en hojas de zanahoria. Los asteriscos denotan las diferencias significativas calculadas mediante la prueba t de Student ($p < 0,05$) con corrección de Welch ($n=2$) **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.1$.

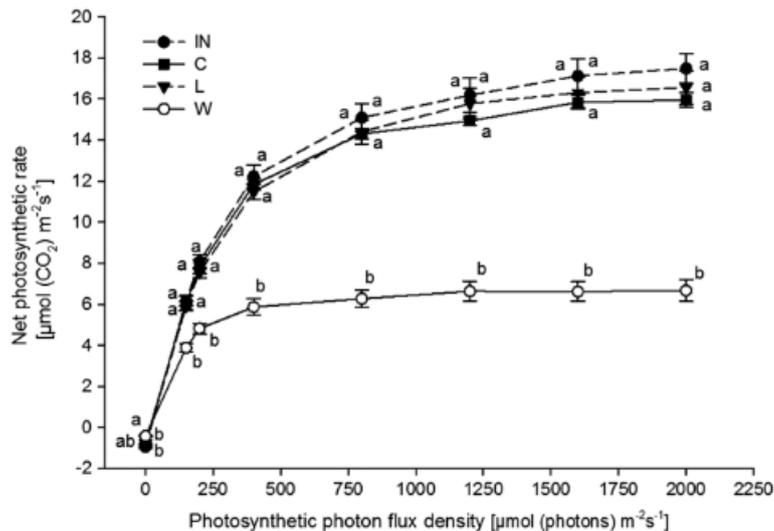


Figura S4. Tasa fotosintética neta a diferentes niveles de luz. Las letras IN, C, L, W denotan los diferentes tratamientos de fertirrigación. Se observa que la tasa de fotosíntesis aumenta a medida que la intensidad de la luz aumenta. Sin embargo, dicho incremento sólo ocurre hasta cierto punto (punto de saturación de luz), a partir del cual la tasa fotosintética se mantiene constante, debido a algún factor limitante [Figura extraída de Pokhrel et al., (2017)].

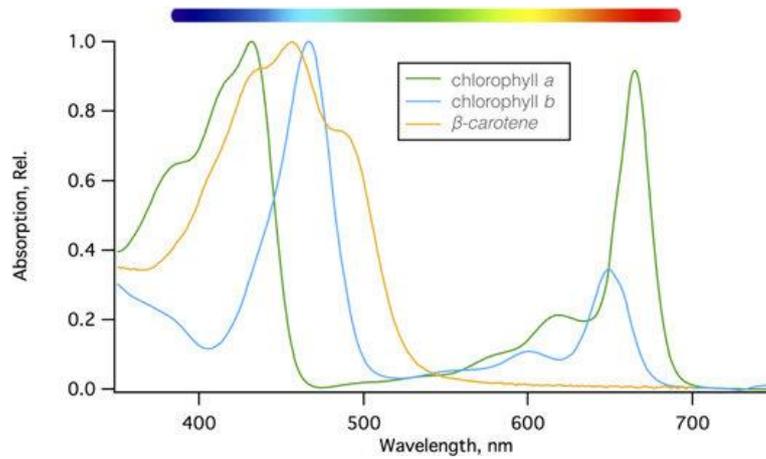


Figura S5. Espectros de absorción básicos clorofila y carotenoides. Las clorofilas absorben la energía de la luz en la parte roja y azul del espectro visible, mientras que los carotenoides sólo absorben la luz en el azul/verde [Figura y descripción extraída de Johnson, (2016)].

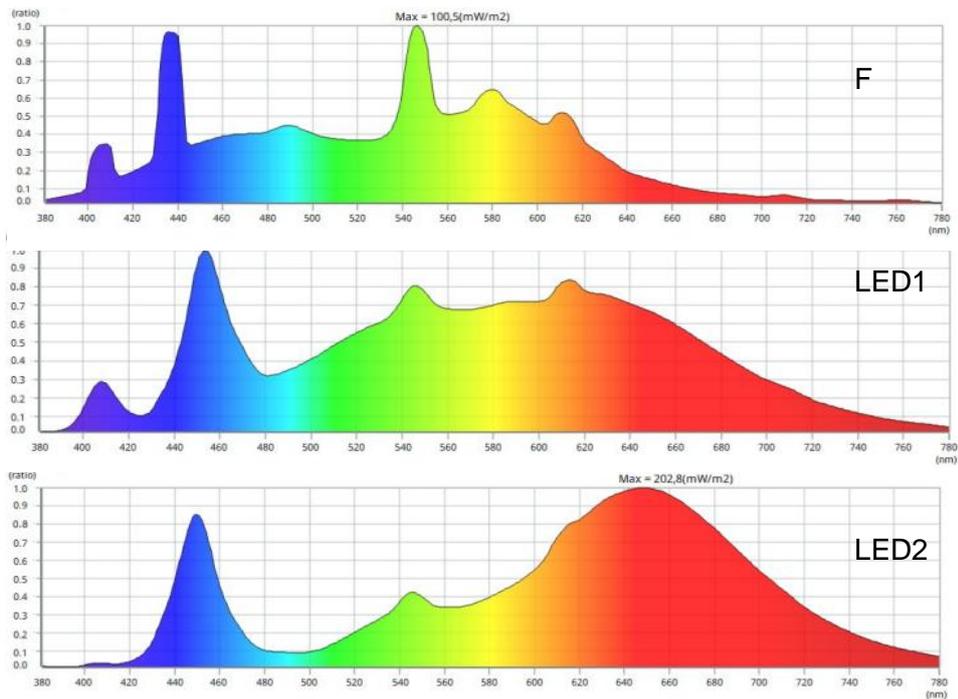


Figura S6. Espectro de luz de las condiciones F, LED1 y LED2. Cada espectro corresponde a los datos de una única medición. Esta fue determinada mediante el uso de un espectrómetro (LI-COR 180) y visualizado mediante *LI-180 Spectrofotometer Software*.

Tabla II. Programa PCR para *actina4*.

Programa termociclador			
N° ciclos	Etapa	T°	Tiempo
1x	Denaturación inicial	94°C	1 min
35x	Denaturación por ciclo	98°C	5 s
	Annealing	52°C	7 s
	Extensión por ciclo	72°C	10 s
1x	Extensión final	72°C	30 s
	Hold	10°C	∞

Tabla III. Programa síntesis ADNc

Programa termociclador	
T°	Tiempo
70°C	5 min
25°C	5 min
60°C	15 s
42°C	90 min
70°C	15 min
12°C	∞

Tabla III. Partidores utilizados para PCR convencional y qRT-PCR^b.

Partidor	Secuencia (5' - 3')	Uso
Actina4.F	CAC ACT TTC TAC AAT GAG CT	Utilizado para determinar la integridad del ADNc sintetizado.
Actina4.R	GCA GTG ATC TCT TTG CTC AT	
DcqActina.F	GTA TGT TGC TAT CCA GGC TGT GCT	Utilizado como gen

DcqActina.R	CCG AAG AAT TGC ATG TGG AAG TGC AT	normalizador en los ensayos de RTqPCR
DcqUbi.F	GCT CGA GGA CGG CAG AAC	Utilizado como gen normalizador en los ensayos de RTqPCR
DcqUbi.R	CTT GGG CTT GGT GTA GGT CTT C	
DcqPsy1.F	ATC GGT GTG GCG AAG TTT GT	Utilizados para la medición de los niveles de expresión del gen <i>DcPSY1</i>
DcqPsy1.R	CAA GAG CCT TGG GCG TGA TA	
DcqPsy2.F	TGG CTC AAG CAG GGC TTT CT	Utilizados para la medición de los niveles de expresión del gen <i>DcPSY2</i>
DcqPsy2.R	ATG CCC ATA CCG GCC ATC TA	
DcqPhyA.F	GCA GTT ACA AGT GAG ATG GTC AGG C	Utilizados para la medición de los niveles de expresión del gen <i>DcPHYA</i>
DcqPhyA.R	ATG GCT TTA TCC ACA GGA AGA CCG	
DcqPhyB.F	TTG AGT CAC CCA CGT ACT GCT GTT	Utilizados para la medición de los niveles de expresión del gen <i>DcPHYB</i>
DcqPhyB.R	CGC AGC GAA TTT AGG ATT GTC TGC C	
DcqPar1.F	AAT GCC AAG CCC TTG AGC CAC	Utilizados para la medición de los niveles de expresión del gen <i>DcPAR1</i>
DcqPar1.R	ATC CTC ATC CTC ATC AGC TCC AGT	
DcqArf6.F	TCA TGA GCT GCG TAG TGA ACTTGC	Utilizados para la medición de los niveles de expresión del gen <i>DcARF6</i>
DcqArf6.R	AGC TGC CAG CCT GAT CTT AAA GGA	
DcqArc6.F	CCG AGG TGT TAG ATG GCC AGATG	Utilizados para la medición de los niveles de expresión del gen <i>DcARC6</i>
DcqArc6.R	TAA GTG AGT AGT CCC AGG ACC AAC C	

^b Partidores diseñados y publicados por Arias D., (2019)

Tabla IV. Programa RT-qPCR

Programa termociclador			
Nº ciclos	Etapa	T°	Tiempo
1x	Denaturación inicial	95°C	10 min
45x	Denaturación por ciclo	90°C	15 s
	Annealing	60°C	15 s
	Extensión por ciclo	72°C	15 s

Tabla V. Densidad de flujo de fotones (PFD) por rango de longitud de onda^a y densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) de las condiciones F, LED1 y LED2.

Tratamiento	PFD ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)					PFD totales ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	PPFD ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
	UV	Azul	Verde	Rojo	Rojo lejano		
F	0,49	15,81	25,02	11,20	1,98	54,5	52,03
LED 1	0,33	15,75	30,45	33,14	6,57	86,6	86,24
LED 2	0,20	19,22	31,15	91,32	23,29	165,2	141,74

^a UV (380-400 nm); azul (400-500 nm); verde (500-600 nm); rojo (600-700 nm); rojo lejano (700-780 nm).