



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

“Transformación estable de *Daucus carota* con los genes carotenogénicos *DcPsy1* y *DcPsy2* y la localización subcelular de *DcPSY1*”

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

Ingeniero en Biotecnología Molecular

Leonardo Antonio Molineros Lucero

Directora del Seminario de Título

Dra. Claudia Stange K.

Co-director del Seminario de Título

Dr. Michael Handford

Marzo 2017

Santiago – Chile

Índice de contenidos

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
1.1.- Estructura y función de los carotenoides	3
1.2.- Biosíntesis de los carotenoides	4
1.3.- Fitoeno sintasa, una enzima clave en la ruta de biosíntesis de carotenoides	6
1.4.- <i>Daucus carota</i> como modelo de estudio	8
Objetivos	11
2.1- Objetivo general	11
2.2- Objetivos específicos	11
Materiales y métodos	12
3.1.- Material biológico	12
3.2.- Plásmidos	13
3.3.- Partidores.....	14
3.4.- Esterilización y siembra de semillas de <i>D. carota</i> en medio MS <i>in vitro</i>	15
3.5.- Cultivo líquido de cepas bacterianas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	16
3.6.- Transformación estable de <i>Daucus carota</i> mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y regeneración <i>in vitro</i>	16
3.7.- Extracción de ADN genómico de <i>Daucus carota</i> a partir de tejido vegetal	17
3.8.- Reacción en cadena de la polimerasa, PCR convencional.....	18
3.9.- Electroforesis en geles de agarosa	20
3.10.- PCR convencional con la enzima <i>Pfu</i> ADN polimerasa para amplificar el ADNc del gen <i>DcPsy1</i> sin codón de <i>stop</i> y electroforesis.....	20
3.11.- Purificación de bandas desde gel de agarosa	21

3.12.- Adición de adeninas a los extremos del producto PCR purificado	21
3.13.- Ligación del producto PCR al vector pCR8/GW/TOPO	21
3.14.- Transformación de <i>E. coli</i> TOP10.....	22
3.15.- PCR de colonia	22
3.16.- Extracción de ADN plasmidial de células de <i>E. coli</i>	22
3.17.- Digestión enzimática para la selección de clones positivos y determinar orientación del ADNc del gen <i>DcPsy1</i>	23
3.18.- Secuenciación del vector PCR - PSY1.....	23
3.19.- Análisis <i>in silico</i> de secuencia del ADNc del gen <i>DcPsy1</i>	23
3.20.- Recombinación de la construcción PCR8 – PSY1 con el vector de destinación pEarlyGate101 mediante recombinación Gateway.....	24
3.21.- Transformación de <i>E. coli</i> TOP10 con el vector pEarlyGate101 – PSY1 y selección de clones positivos	24
3.22.- Preparación de cepas bacterianas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 quimiocompetentes y transformación con el vector pEarlyGate101 – PSY1.....	24
3.23.- Transformación transitoria de hojas de <i>Nicotiana tabacum</i>	25
3.24.- Microscopía de epifluorescencia	26
Resultados	27
4.- Obtención de plantas transgénicas de <i>D. carota</i> para los genes <i>DcPsy1</i> y <i>DcPsy2</i>	
4.1.- Transformación estable de explantes de <i>Daucus carota</i> con los genes <i>DcPsy1</i> y <i>DcPsy2</i>	27
4.2.- Análisis de la transgénesis de las líneas de <i>Daucus carota</i> transformadas con los vectores pGWB2 – PSY1 y pGWB2 – PSY2 mediante PCR	30
5.- Localización subcelular de la proteína DcPSY1.	33
5.1.- Amplificación del ADNc del gen <i>DcPsy1</i> de <i>Daucus carota</i> sin codón de término de la traducción y su purificación	33
5.2.- Generación del vector PCR8 – PSY1	34

5.3.- Análisis de restricción enzimático del vector PCR8 – PSY1.....	35
5.4.- Secuenciación del vector PCR8 – PSY1 y análisis <i>in silico</i> del ADNc del gen <i>DcPsy1</i>	36
5.5.- Análisis <i>in silico</i> de la localización subcelular de DcPSY1.	39
5.6.- Obtención del vector pEarlyGate101 - PSY1 para el ensayo de localización subcelular.	41
5.7.- Localización subcelular mediante transformación transiente de hojas de <i>N. tabacum</i> con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 pEarlyGate101 – PSY1.....	44
Discusión	46
6.1.- Transformación estable de explantes de <i>Daucus carota</i>	46
6.2.- Análisis <i>in silico</i> de la secuencia del ADNc del gen <i>DcPsy1</i>	49
6.3.- Ensayo de localización subcelular de la proteína DcPSY1:YFP	50
Conclusión	51
Referencias	52

Índice de tablas

Tabla I.- Cepas bacterianas utilizadas durante este seminario de título.....	12
Tabla II.- Material vegetal utilizado durante la realización de este seminario de título..	12
Tabla III. - Plasmidios usados durante la realización de este seminario de título.....	13
Tabla IV.- Lista de partidores utilizados durante el desarrollo del trabajo de este Seminario de Título.....	15
Tabla V.- Programa utilizado para la amplificación de un fragmento de 624 pb del gen <i>hptII</i>	19
Tabla VI.- Programa utilizado para la amplificación de un fragmento de 764 pb del gen <i>DcLcyb1</i>	19
Tabla VII.- Programa utilizado para la amplificación del ADNc de <i>DcPsy1</i> sin el codón de término de la traducción.....	19
Tabla VIII.- Programa de PCR con <i>Pfu</i> polimerasa utilizado para la amplificación del gen <i>DcPsy1</i> sin codón de <i>stop</i>	21
Tabla IX.- Tamaños de fragmentos generados al realizar una digestión enzimática del vector PCR – PSY1 con las enzimas <i>HpaI</i> y <i>NdeI</i>	35
Tabla X.- Resultados del análisis <i>in silico</i> en el software ChloroP 1.1 de las secuencias proteicas codificadas por el gen <i>DcPsy1</i> descrito en literatura y el secuenciado.....	40
Tabla XI.- Tamaños de fragmentos generados al realizar una digestión enzimática del vector pEarlyGate101 – PSY1 con la enzima <i>BcuI</i>	42

Índice de figuras

Figura 1.- Representación de la vía de biosíntesis de carotenoides y rutas directamente relacionadas.....	6
Figura 2.- Expresión relativa del gen <i>DcPsy1</i> y <i>DcPsy2</i> durante el desarrollo de las hojas y la raíz modificada de la zanahoria.....	9
Figura 3.- Esquema de los vectores pCR8/GW/TOPO, pEarlyGate101, pGWB2 – PSY1 y pGWB2 – PSY2.....	14
Figura 4.- Fotografías de la regeneración <i>in vitro</i> de los explantes de <i>D. carota</i>	29
Figura 5.- Fotografías de la regeneración de explantes de <i>D. carota</i>	30
Figura 6.- Amplificación de fragmentos de los genes <i>Lcyb</i> y <i>hptII</i> a partir de ADNg de plantas transformadas con el vector pGWB2 – PSY1.....	32
Figura 7.- Amplificación de fragmentos de los genes <i>Lcyb</i> y <i>hptII</i> a partir de plantas transformantes con el vector pGWB2 – PSY2.....	32
Figura 8.- Amplificación por PCR del ADNc del gen <i>DcPsy1</i> sin codón de <i>stop</i>	33
Figura 9.- Amplificación por PCR del ADNc de <i>DcPsy1</i> sin codón de <i>stop</i> utilizando <i>Pfu</i> polimerasa.....	34
Figura 10.- Amplificación del ADNc del gen <i>DcPsy1</i> sin codón de <i>stop</i> de colonias de <i>E. coli</i> transformadas con el vector PCR8 – PSY1.....	35
Figura 11.- Digestión enzimática con las enzimas <i>HpaI</i> y <i>NdeI</i> realizada al ADNp de las colonias PCR8 – PSY1.....	36
Figura 12.- Alineamiento de nucleótidos entre el marco de lectura abierto del gen <i>DcPsy1</i> y la secuencia (Seq) obtenida por secuenciación.....	37

Figura 13.- Alineamiento de aminoácidos de la proteína que codifica el gen <i>DcPsy1</i> reportado en la literatura y deducida desde la secuencia (Seq) obtenida por secuenciación.....	38
Figura 14.- Representación de vector generado al ligar el gen <i>DcPsy1</i> en el vector pCR8/GW/TOPO.....	39
Figura 15.- Representación de los dominios presentes en la proteína DcPSY1.....	41
Figura 16.- Amplificación del ADNc del gen <i>DcPsy1</i> sin codón de <i>stop</i> de colonias de <i>E. coli</i> transformadas con el vector pEarlyGate101 – PSY1.....	42
Figura 17.- Digestión enzimática con la enzima <i>BcuI</i> realizada al ADNp de colonias pEarlyGate101 – PSY1.....	43
Figura 18.- Representación de vector generado al recombinar por tecnología Gateway el vector PCR8 – PSY1 con el de destinación pEarlyGate101-PSY1.....	43
Figura 19.- Amplificación del ADNc del gen <i>DcPsy1</i> sin codón de <i>stop</i> de colonias de <i>A. tumefaciens</i> transformadas con el vector pEarlyGate101 – PSY1.....	44
Figura 20.- Localización subcelular de la proteína de fusión DcPsy1:YFP en células epidermales de hojas de tabaco.....	45

Lista de abreviaturas

- 2,4-D : Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- aá : Aminoácido
- ABA : Ácido Abscísico
- ADN : Ácido desoxirribonucleico
- ADNc : Ácido desoxirribonucleico complementario
- ADNg : Ácido desoxirribonucleico genómico
- CTAB : Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
- D.O. : Densidad Óptica
- dpc : Días pos cultivo
- dNTP : Desoxinucleótido trifosfato
- h : Horas
- min : Minutos
- mL : Mililitro
- mM : Milimolar
- MS : Murashige y Skoog
- nM : Nanomolar
- pb : Pares de bases
- PCR : Reacción en cadena de la Polimerasa
- PSY : Fitoeno sintasa
- μ L : Microlitro
- μ M : Micromolar
- μ m : Micrometro
- wt : Silvestre

Resumen

Los carotenoides son compuestos isoprenoides que en plantas participan durante la fotosíntesis como pigmentos accesorios, protegen contra el daño foto-oxidativo y son precursores del ácido abscísico. En mamíferos los carotenoides son la principal fuente para la síntesis de vitamina A, además de actuar como antioxidantes. Debido a esta vital importancia para plantas y humanos es que se ha enfocado el estudio en la ruta metabólica con el fin de aumentar la cantidad de carotenoides en los alimentos de consumo humano. Se ha descrito que, en la ruta de biosíntesis de carotenoides, la primera enzima de la ruta llamada fitoeno sintasa (PSY) es un punto clave y altamente regulado. En *Daucus carota*, nuestro modelo de estudio, se han descrito dos genes que codifican a PSY, *DcPsy1* y *DcPsy2*. Estos genes se expresan diferencialmente en hojas y raíz durante el desarrollo de la planta, y además se ha determinado que la región promotora del gen *DcPsy2* presenta elementos en cis regulados por luz, fitohormonas y estrés abiótico. Se ha evidenciado la funcionalidad de estos dos genes *in vivo* al sobreexpresarlos en *Nicotiana tabacum*, donde promueven un aumento de carotenoides. Sin embargo, no se ha determinado si en la propia *D. carota*, ambos genes realmente participan en la biosíntesis de carotenoides en hojas y/o raíz, ya que podrían estar cumpliendo una función órgano específica, como sucede en otras plantas.

En este seminario de título, se transformaron explantes de *D. carota* con vectores que permiten la sobreexpresión del gen *DcPsy1* y *DcPsy2*, con el fin de obtener plantas transgénicas que serán utilizadas en futuros análisis de expresión y acumulación de carotenoides. Se obtuvieron exitosamente 11 líneas transgénicas de plantas de *D. carota* transformadas con el vector que permite la sobreexpresión del gen *DcPsy1* y 7 líneas transgénicas de plantas transformadas con el vector para la sobreexpresión del gen *DcPsy2*. Además, por medio de la expresión en hojas de tabaco de una proteína de fusión entre el producto del gen *DcPsy1* y la proteína fluorescente YFP (PSY1:YFP), se determinó que la localización subcelular de la proteína PSY1 es en plastidio. De este modo se comprobó su correcta localización subcelular, lo que aporta un antecedente importante sobre su funcionalidad, dado que los carotenoides se producen en los plastidios de células vegetales.

Abstract

Carotenoids are isoprenoid compounds that fulfill important functions in plants. They act as accessory pigments during photosynthesis, protect cells against photooxidative damage and are precursors of abscisic acid. In mammals, carotenoids are the main source for the synthesis of vitamin A and have very powerful antioxidant properties. Due to these characteristics, since several years the studies have focused on modifying the metabolic pathway in order to increase the amount of carotenoids in food for human consumption. It has been described that, phytoene synthase (PSY), the first enzyme in the pathway, is a key point of carotenoid synthesis regulation. In *Daucus carota*, our plant model, two genes coding for PSY have been described, *DcPsy1* and *DcPsy2*. These genes are differentially expressed in leaves and root during plant development. Also, *DcPsy2*, and not *DcPsy1*, responds to ABA which correlates with the presence of cis elements that are regulated by light, phytohormones and abiotic stress that are present in the *DcPsy2* promoter. The functionality of these two genes has been evidenced *in vivo* by heterologous expression in *Nicotiana tabacum*, where they promote an increase of carotenoids. However, it has not been determined in *D. carota* itself, if both genes actually participate in the biosynthesis of carotenoids in leaves and/or root, since they could be fulfilling different functions in the plant in a specific organ way, as has been reported for other plants.

In this work, explants of *D. carota* were transformed with vectors for *DcPsy1* and *DcPsy2* overexpression, to obtain transgenic plants that will be used in future functional analysis. We successfully obtained 11 transgenic lines of *D. carota* plants transformed with the vector for *DcPsy1* overexpression and 7 transgenic lines of plants transformed to overexpress *DcPsy2* gene. In addition, we generated a construct for *DcPsy1* subcellular localization. A fusion protein between the product of the *DcPsy1* gene and the fluorescent protein YFP (PSY1:YFP), let us to conclude that DcPSY1 protein has a plastidial localization. This result provides arguments about its functionality because carotenogenic enzymes are located in plant plastids where carotenoids are produced.

Introducción

1.1.- Estructura y función de los carotenoides

Los carotenoides son un grupo de compuestos isoprenoides liposolubles, que son sintetizadas por todos los organismos fotosintéticos, como plantas, algas y cianobacterias, y además por algunas bacterias y hongos no fotosintéticos (Lu y Li, 2008). A la fecha se han descrito más de 700 carotenoides, que, de acuerdo a su estructura, se clasifican en dos grupos: I) Los carotenos, que son carotenoides que sólo presentan átomos de carbono e hidrógeno en su estructura, y las II) xantofilas, que, además, presentan átomos de oxígeno en su esqueleto (Britton, 1995).

Las moléculas de los carotenoides se forman a partir de la condensación de 8 unidades de isopreno de 5 carbonos cada una, dando origen a un esqueleto hidrocarbonado de 40 carbonos, el cual puede presentar hasta un máximo de 15 dobles enlaces carbono-carbono conjugados en su estructura. Además, pueden tener grupos cíclicos en cada uno de sus extremos (Britton, 1995). La cantidad de dobles enlaces que presente la estructura del carotenoide, su disposición y si tiene o no grupos cíclicos en sus extremos, le confiere diferentes características físicas, químicas y biológicas a cada uno. Un ejemplo de esto, son los carotenos, los cuales pueden absorber longitudes de ondas que van desde los 400 nm hasta los 500 nm, confiriéndoles colores que van desde el amarillo, naranja al rojo (Giorio y cols., 2007).

En plantas los carotenoides se acumulan en los plastidios (Cunningham y Gantt, 1998). Dentro de las funciones biológicas que cumplen estos pigmentos en plantas, se destaca su participación como moléculas estabilizadoras de membrana y como pigmentos accesorios cosechadores de luz (complejos pigmentos – proteína en los tilacoides) durante el proceso de fotosíntesis. Además, protegen a las células vegetales del daño foto-oxidativo mediante la disipación del exceso de energía lumínica, y en el caso de las xantofilas estas eliminan de forma indirecta especies reactivas de oxígeno (EROs) mediante su ciclo de formación (Latowski. y cols., 2011). También se ha descrito que los carotenoides promueven la polinización y la atracción de agentes dispersores de semillas al otorgarle colores vistosos a las flores y frutos (Howitt y Pogson, 2006; Goodwin, 2012). Por otro lado, los carotenoides son precursores de apocarotenoides como el ácido abscísico (ABA) (Botella-Pavia y cols.,

2004), el cual se ha descrito que participa en el desarrollo de las plantas, en mantener la dormancia de las semillas, y en la modulación de respuestas a estrés abiótico como la sequía, el frío y el estrés salino (Barrero y cols., 2008; Cutler y cols., 2010). Por último, los carotenoides se encuentran involucrados en la producción de otros apocarotenoides involucrados en la defensa contra distintos patógenos y en otorgar aroma a ciertas especies vegetales (Auldridge y cols., 2006).

En el caso de los animales, debido a que no son capaces de sintetizar carotenoides *de novo*, deben incorporarlos desde su dieta, ya que los carotenoides son los precursores de la vitamina A y los retinoides (Bollag, 1996). En particular, se ha descubierto que el β -caroteno presenta la mayor actividad pro-vitamina A entre los carotenoides, que el licopeno posee una buena actividad antioxidante y que la luteína protege a las células de la mácula de la retina contra el daño causado por radiación (Giorio y cols., 2007). Debido al pobre consumo de alimentos ricos en carotenoides en ciertas regiones del mundo, hay un alto índice de desórdenes asociados a la deficiencia de vitamina A (VAD), los cuales comprometen al sistema inmune, incrementando la severidad de infecciones, enfermedades y en los casos más extremos causar ceguera permanente (Black y cols., 2003). Por lo cual, investigar la ruta de biosíntesis de carotenoides y desarrollar nuevos métodos para que se acumulen con mayor eficiencia en distintos tipos de alimentos de consumo humano, ha sido abordado desde hace años (Paine y cols., 2005; Alos y cols., 2016).

1.2.- Biosíntesis de los carotenoides

En plantas superiores, la vía de biosíntesis de los carotenoides se encuentra altamente conservada y se ha descrito la mayoría de los genes involucrados en la ruta (Cunningham y Gantt.1998).

Los genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides se localizan en el genoma nuclear y una vez las proteínas ya son sintetizadas, son dirigidas a los plastidios como pre-proteínas, lugar donde sufren modificaciones post-traduccionales a través del corte proteolítico de su extremo amino-terminal que funciona como la señal de destinación a plastidios (Soll y cols., 2004). Los precursores de los carotenoides son sintetizados en los plastidios de células vegetales por la ruta del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (Vía MEP), donde participan las enzimas desoxixilulosa 5 – fosfato sintasa (DXS),

desoxixilulosa 5 – fosfato reductasa (DXR), hidroximetilbutenil pirofosfato sintasa (HDS) y hidroximetilbutenil pirofosfato reductasa (HDR) para producir la molécula de isopentenil pirofosfato (IPP) por la condensación de gliceraldehído-3 fosfato con piruvato (Rodríguez-Concepción y Boronat. 2002).

La adición secuencial de moléculas de IPP a una molécula del isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP) produce la formación de geranil pirofosfato (GPP) a partir de la cual se sintetiza geranilgeranil pirofosfato (GGPP) por medio de la enzima geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPPS) (Bramley. 2002). A partir de este precursor se sintetizan todos los carotenoides y también moléculas como clorofilas y giberelinas (Figura 1). La condensación de dos moléculas de GGPP catalizada por una enzima que es limitante en la ruta, la fitoeno sintasa (PSY) (Welsh y cols., 2007) origina al primer caroteno de la ruta, el fitoeno (carotenoide incoloro). Luego, ocurren una serie de desaturaciones e isomerizaciones sobre la molécula de fitoeno para producir el pigmento licopeno. Las desaturaciones son catalizadas por las enzimas fitoeno desaturasa (PDS) y ζ -caroteno desaturasa (ZDS). La enzima PDS conduce a la formación de ζ -caroteno (el primer carotenoide de color amarillo), y la enzima ZDS a la formación del pigmento pro-licopeno (Fraser y Bramley, 2004). Posteriormente, el pro-licopeno, que se encuentra como poli-cis licopeno, es isomerizado por las enzimas ζ -caroteno isomerasa (ZISO) y caroteno isomerasa (CRTISO) para dar origen a all-trans licopeno, pigmento de coloración roja (Auldridge y cols. 2006). En hojas, la actividad de CRTISO es sustituida por la luz la cual fotoisomeriza al pre-licopeno (Bartley y Scolnik, 1995; Isaacson y cols., 2002). A partir del licopeno se genera el punto de ramificación de la ruta. Si este pigmento es ciclado en sus dos extremos por la enzima licopeno β -ciclase (LCYB, actuando como homodímero), se sintetiza el β -caroteno. Por otro lado, si es ciclado por la enzima LCYB en conjunto con la enzima licopeno ϵ -ciclase (LCYE) dan origen al α -caroteno. Luego, el α -caroteno es hidroxilado en sus dos anillos formando luteína, mientras que el β -caroteno, a través de una serie de hidroxilaciones y epoxidaciones permite la formación de los compuestos denominados xantófilas y finalmente al ABA (Cunningham y Gantt, 1998). La ruta previamente descrita se puede observar en la figura 1.

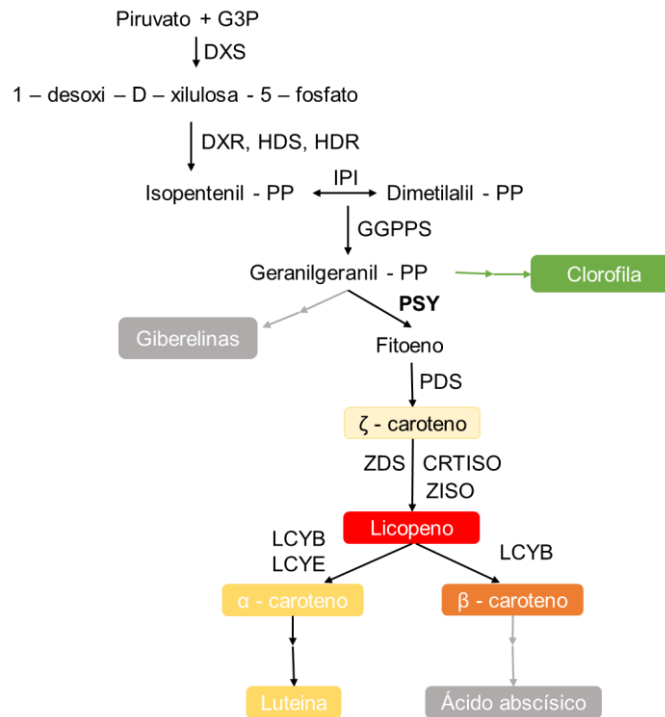


Figura 1.- Representación de la vía de biosíntesis de carotenoides y rutas directamente relacionadas. Diagrama simplificado de las enzimas y principales productos de la vía de biosíntesis de carotenoides. G3P: gliceraldehído – 3 – fosfato. DXS: desoxi-xilulosa-5-fosfato sintasa. DXR: desoxi – xilulosa - 5 - fosfato reductasa, HDS: hidroximetilbutenil pirofosfato sintasa, HDR: hidroximetilbutenil pirofosfato reductasa IPI: isopentenil pirofosfato isomerasa, GGPPS: geraniilgeraniol pirofosfato sintasa PSY: fitoeno sintasa, PDS: fitoeno desaturasa, ZDS: ζ-caroteno desaturasa, ZISO: ζ - caroteno isomerasa, CRTISO: caroteno isomerasa, LCYE: licopeno ε - ciclasa, LCYB: licopeno β - ciclasa.

1.3.- Fitoeno sintasa, una enzima clave en la ruta de biosíntesis de carotenoides

El gen *Psy* es considerado uno de los genes claves para la biosíntesis de carotenoides, ya que codifica a la enzima PSY, la cual es la primera enzima que participa directamente en la ruta metabólica de los carotenoides y es la que cataliza la condensación de dos moléculas de GGPP para producir el primer carotenoide de la ruta, fitoeno (Cunningham y Gantt, 1998; Shewmaker y col., 1999; Bramley 2002; Fraser y Bramley, 2004). El fitoeno es una molécula de 40 carbonos, incolora que posee 3 enlaces conjugados (Bartley y Scolnik, 1993; Sandmann, 1994; Fraser y Bramley, 2004).

La proteína PSY, fue purificada por primera vez desde cromoplastos de *Capsicum annuum* (pimentón) (Dogbo y cols., 1988). Mediante complementación heteróloga en bacterias y análisis enzimático *in vitro*, se descubrió una fitoeno sintasa funcional en frutos de tomate (*Psy1*) (Bartley y col., 1992) y posteriormente, se descubrió otra fitoeno sintasa específica para hojas (*Psy2*) de la misma especie (Bartley y Scolnik, 1993; Sadmann, 1994).

Desde su descubrimiento, el gen *Psy* ha sido estudiado y caracterizado en diversas especies vegetales a través de los años. Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* (Scolnik y Bartley, 1994), *Zea mays* (maíz) (Buckner y cols., 1996), *Cucumis melo* (melón) (Karvouni y col., 1995), *Brassica napus* (canola) (Shewmaker y col., 1999), *Solanum lycopersicum* (tomate) (Fraser y cols., 1994), *Solanum tuberosum* (papa) (Diretto y col., 2007) y *Oryza sativa* (arroz) (Ye y cols., 2000; Paine y col., 2005). En base a los estudios realizados, se ha propuesto que la proteína PSY en su forma inactiva se encontraría soluble en plastidios formando parte de un complejo hetero-oligomérico y que en su forma activa se encontraría asociada periféricamente a la membrana (Schledz y cols., 1996; Bonk y cols., 1997; Fraser y Bramley, 2004; Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012).

Dentro de las plantas que se han estudiado, existen algunas que sólo presentan un gen *Psy* como es el caso de *A. thaliana* y especies que poseen más de un gen *Psy*, como es el caso de la zanahoria, tomate, tabaco, maíz y arroz (Scolnik y Bartley 1994; Busch y cols., 2002; Li y cols., 2008; Welsch y cols., 2008; Clotault y cols., 2008). Los parálogos de este gen pueden presentar función órgano específica, como es el caso de los genes *Psy* que posee la planta de tomate, en la cual el gen *Psy1* se expresa sólo en frutos y es responsable de la biosíntesis de carotenoides en los mismos, *Psy2* es el responsable en hojas y flores (Bartley y Scolnik, 1993; Fraser y cols., 1999), y *Psy3* es el responsable en raíz (Fantini y cols., 2013). En el caso del arroz y maíz, donde también se han descrito tres genes *Psy*, la expresión del gen *Psy1* y *Psy2* es inducida por luz en órganos fotosintéticos, mientras que *Psy3* aumenta su expresión bajo condiciones de estrés hídrico y tratamientos con ABA (Li y cols., 2008; Welsch y cols., 2008). Estos estudios sobre los genes *Psy* han sugerido que existe una función órgano específica de los distintos genes presentes en algunas especies vegetales.

Se ha descrito que existe una relación directa entre los niveles de transcrito de *Psy* con la acumulación de carotenoides en frutos de tomate (Fraser y cols., 1999) y frutos de cítricos (Ikoma y cols., 2001; Kato y cols., 2004). Por otro lado, análisis de expresión de genes carotenogénicos en *Gentiana lutea* indican que la expresión del gen *Psy* conlleva a un aumento en la síntesis de carotenoides en sus flores (Zhu y cols., 2002; Zhu y cols., 2003).

Debido a la importancia de PSY en la ruta de biosíntesis de carotenoides, éste ha sido uno de los blancos para diferentes estrategias biotecnológicas que buscan aumentar su expresión con el fin de elevar los niveles de carotenoides en distintas especies vegetales de consumo humano que puedan o no acumular naturalmente una gran cantidad de carotenoides (Lindgren y cols., 2003; Ducreux y cols., 2005). Un ejemplo de lo antes expuesto es en la planta de tomate, donde se sobre-expresó el gen *Psy1* y se encontró que los niveles totales de carotenoides aumentaron 2 veces en las plantas transgénicas en comparación a las silvestres (Fraser y cols., 2007). Esta misma relación se encontró al sobreexpresar *Psy* en frutos de cítricos (Zhang y cols., 2009).

Si bien se ha estudiado extensamente la vía de biosíntesis de carotenoides en hojas, frutos y flores, existe poco conocimiento acerca de su regulación en órganos como las raíces.

1.4.- *Daucus carota* como modelo de estudio

Daucus carota (zanahoria) es una planta dicotiledónea y es especialmente interesante debido a que la variedad de zanahoria de color naranja sintetiza y acumula los mayores niveles de carotenoides (principalmente α -y β -caroteno) en la raíz modificada sólo en condiciones de oscuridad, lo cual es poco común (Stange y cols., 2008). La diferencia de colores en las variedades de zanahoria que van del amarillo, rojo, blanco, púrpura y naranja se debe a la diferencia en la composición de los distintos carotenoides acumulados. En la zanahoria naranja, el α -y β -caroteno representan el 95% de los carotenoides totales de la raíz (Fraser y Bramley, 2004; Baranska y cols., 2006; Clotault y cols., 2008).

En esta planta al igual que en otros modelos, existen dos genes *Psy* de expresión diferencial, el gen *DcPsy1* y el gen *DcPsy2* (Fuentes y cols. 2012). Se ha determinado que el gen *DcPsy1* presenta una mayor expresión en hojas maduras, mientras que el gen *DcPsy2* presenta una mayor expresión en hojas jóvenes de 4 semanas de edad. Por otro lado, en raíz, tanto el gen *DcPsy1* como el gen *DcPsy2* aumentan su expresión a las 12 semanas en comparación a las 4 semanas, pero *DcPsy2* aumenta su expresión 18 veces en comparación a *DcPsy1* (Fuentes y cols., 2012, figura 2). Esta evidencia sugiere que pueden estar cumpliendo una función órgano específica.

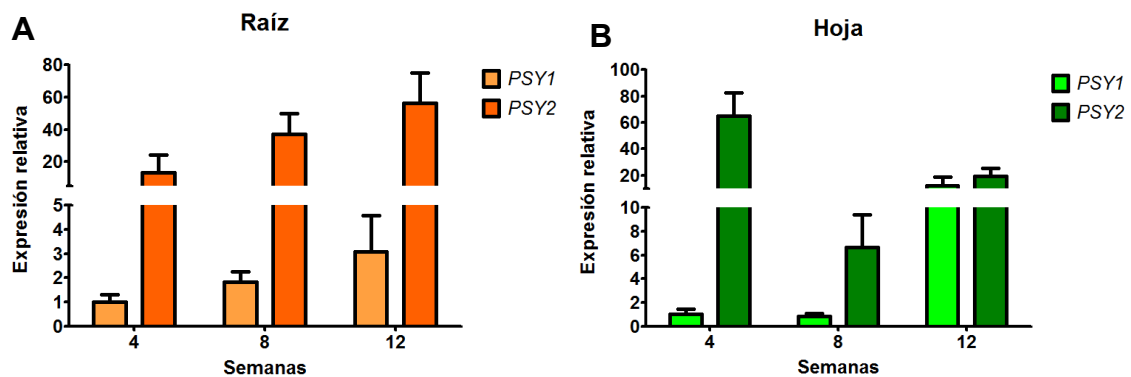


Figura 2.- Expresión relativa del gen *DcPsy1* y *DcPsy2* durante el desarrollo de las hojas y la raíz modificada de la zanahoria. A) Niveles de expresión relativa de *DcPsy1* y *DcPsy2* en la raíz modificada durante su desarrollo. B) Niveles de expresión relativa de *DcPsy1* y *DcPsy2* en la hoja durante el desarrollo de la zanahoria. El nivel de expresión del gen *DcPsy1* a las 4 semanas fue utilizado como calibrador. Gráficos generados en base a información de Fuentes y col., 2012.

En nuestro grupo de trabajo, se ha demostrado la funcionalidad del gen *DcPsy1* y el gen *DcPsy2* en la ruta de biosíntesis de carotenoides al expresarlos en plantas de *N. tabacum* (Acevedo. 2011), observándose que en líneas transgénicas *DcPsy1* y *DcPsy2* se acumula un mayor nivel (en promedio un 1,5 veces) de β -caroteno y de carotenoides totales en comparación a las líneas silvestres. Aún queda por determinar si en *D. carota*, ambos genes realmente participan en la biosíntesis de carotenoides en hojas y/o raíz, ya que podrían estar cumpliendo una función órgano específica. Se

tiene como evidencia, que en *N. tabacum*, cuando se expresa el gen *DcPsy2* se promueve una mayor resistencia al estrés salino (Acevedo. 2013) y que en la región promotora se identifican elementos en cis regulados por luz, fitohormonas y estrés (Fuentes, 2011). Es por ello que se propuso en este seminario de título transformar la planta modelo *D. carota*, con vectores que expresen constitutivamente los genes *DcPsy1* y *DcPsy2* para en un futuro poder analizar el fenotipo de las plantas generadas, la composición, cantidad de carotenoides y clorofilas, así como la respuesta de las plantas frente a estrés abiótico.

Por otro lado, debido a que realmente no se ha descubierto una secuencia “consenso” de señalización a cloroplasto que satisfaga a los diferentes grupos de proteínas que se dirigen a dicho compartimiento (Barry. 2000), es importante determinar a nivel funcional la localización subcelular de estas proteínas ya que es necesaria una localización plastidial de estas enzimas para interactuar con las otras enzimas carotenogénicas para la síntesis de carotenoides. Previamente se corroboró la correcta localización plastidial de *DcPSY2* (Peirano. 2013) y en este seminario de título se evaluó la localización subcelular de *DcPSY1*.

Objetivos

2.1- Objetivo general

Obtener líneas transgénicas de *Daucus carota* para los genes *DcPsy1* y *DcPsy2* de la ruta de biosíntesis de carotenoides y estudiar la localización subcelular de la proteína DcPSY1.

2.2- Objetivos específicos

- Transformar establemente explantes de *Daucus carota* con el gen *DcPsy1* y con *DcPsy2* para obtener líneas transgénicas verificadas mediante PCR.
- Estudiar la localización subcelular de la proteína DcPSY1 mediante transformación transiente de hojas de *Nicotiana tabacum* con un vector que permita la expresión de una proteína de fusión entre DcPSY1 y una proteína fluorescente.

Materiales y métodos

3.1.- Material biológico

Las cepas bacterianas utilizadas en este seminario de título se muestran en la tabla I y el material vegetal se muestra en la tabla II. La cepa de *A. tumefaciens* GV3101 pGWB2 – PSY1 fue generada por Romina Carvajal en su seminario de título (Carvajal, 2010). La cepa de *A. tumefaciens* GV3101 pGWB2 – PSY2 fue generada por Orlando Acevedo en su seminario de título (Acevedo, 2011).

Tabla I. Cepas bacterianas utilizadas durante este seminario de título.

Cepa bacteriana	Plasmidio que porta	Resistencias a antibióticos
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	<i>Helper</i>	Gentamicina y rifampicina
<i>A. tumefaciens</i> GV3101 pGWB2 – PSY1	<i>Helper</i> y pGWB2 - PSY1	Gentamicina, rifampicina, higromicina y kanamicina
<i>A. tumefaciens</i> GV3101 pGWB2 – PSY2	<i>Helper</i> y pGWB2 – PSY2	Gentamicina, rifampicina, higromicina y kanamicina
<i>A. tumefaciens</i> GV3101 pEarlyGate101 – PSY1	<i>Helper</i> y pEarlyGate101 – PSY1	Gentamicina, rifampicina y kanamicina
<i>E. coli</i> TOP10	-	-
<i>E. coli</i> TOP10 PCR8 – PSY1	PCR8 – PSY1	Espectinomicina

El plasmidio *Helper* es el plasmidio Ti desarmado que la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 porta y es necesario para la transformación de las plantas.

Tabla II.- Material vegetal utilizado durante la realización de este seminario de título.

Material vegetal	Características
<i>Daucus carota</i> variedad nantes	Variedad naranja de zanahoria. Las semillas fueron conseguidas de entidades comerciales
<i>Nicotiana tabacum</i> variedad xanthi NN	Plantas de tabaco cultivadas por un mes en tierra para ser transformadas transientemente

3.2.- Plásmidos

En la tabla III se muestran los plasmidios usados durante este trabajo. El esquema de los vectores PCR8/GW/TOPO, pEarlyGate101, pGWB2 – PSY1 y pGWB2 – PSY2 se muestran en la figura 3. El esquema del vector PCR8 – PSY1 y pEarlyGate101 – PSY1 se muestran en la figura 14 y 18 respectivamente.

Tabla III.- Plasmidios usados durante la realización de este seminario de título.

Plasmidio	Características
PCR8/GW/TOPO	Vector de entrada de 2.817 pb tipo Gateway®. Posee asociada la enzima topoisomerasa. Presenta un gen que codifica a la resistencia a espectinomicina, un origen de replicación pBR322 y los sitios attL que permiten la recombinación con un vector de destinación tipo Gateway®.
pEarlyGate101	Vector de destinación de 12.454 pb tipo Gateway®. Presenta un gen que codifica a la resistencia a kanamicina en bacterias, un origen de replicación tipo pUC, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, los sitios LB y RB, un gen que codifica a la proteína fluorescente amarilla YFP, los sitios AttR, un gen que codifica para la proteína toxica CcdB en bacterias y un gen que codifica a la resistencia a cloranfenicol.
pGWB2 - PSY1	Vector de expresión de 17.745 pb de tipo Gateway®. Presenta un gen que codifica a la resistencia a higromicina, un gen que codifica a la resistencia a kanamicina, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, los sitios LB y RB y el gen <i>DcPsy1</i> .
pGWB2 – PSY2	Vector de expresión de 18.533 pb de tipo Gateway®. Presenta un gen que codifica a la resistencia a higromicina, un gen que codifica a la resistencia a kanamicina, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, los sitios LB y RB y el gen <i>DcPsy2</i> .
PCR8 – PSY1	Vector de entrada de 4.011 pb de tipo Gateway®. Presenta un gen que codifica a la resistencia a espectinomicina, un origen de replicación pBR322, el ADNc del gen <i>DcPsy1</i> sin codón de <i>stop</i> y los sitios attL que permiten la recombinación con un vector de destinación tipo Gateway®.
PEarlyGate101 – PSY1	Vector de expresión de 12.020 pb de tipo Gateway®. Presenta un gen que codifica a la resistencia a kanamicina en bacterias, un origen de replicación tipo pUC, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, los sitios LB y RB, un gen que codifica a la proteína fluorescente amarilla YFP, los sitios AttB y el ADNc del gen <i>DcPsy1</i> sin codón de <i>stop</i> ,

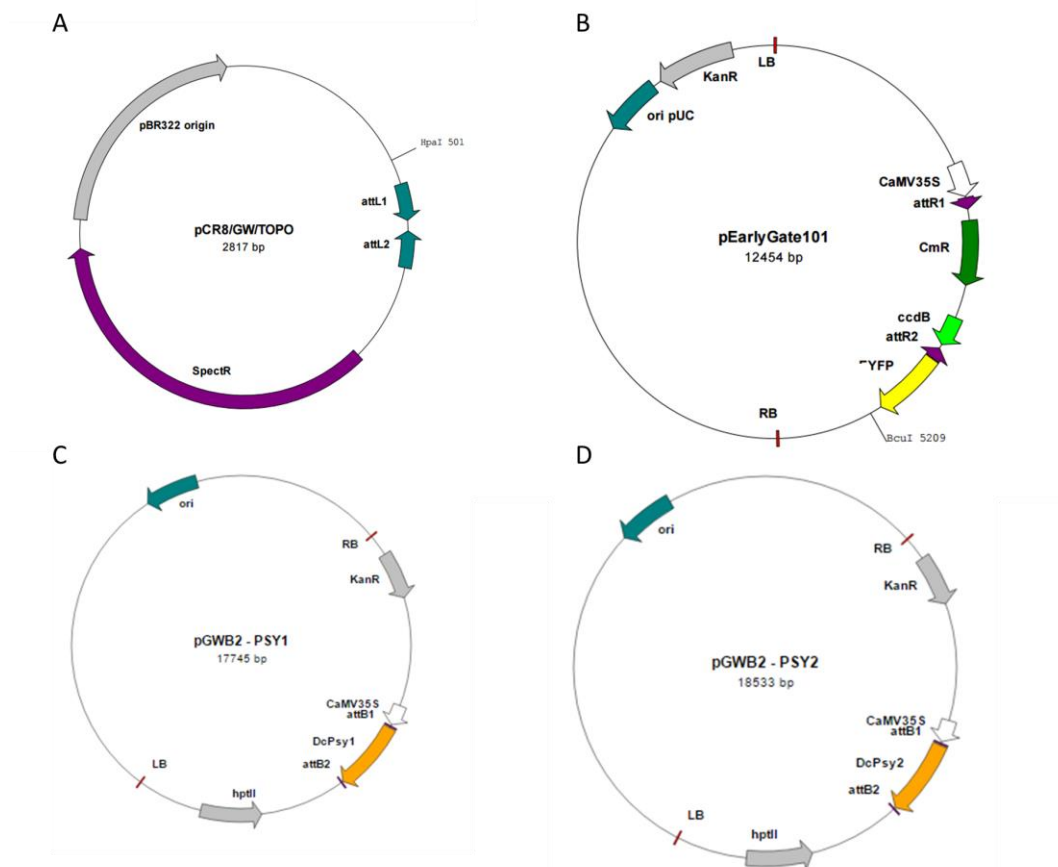


Figura 3.- Esquema de los vectores pCR8/GW/TOPO, pEarlyGate101, pGWB2 – PSY1 y pGWB2 – PSY2. A) Vector de clonamiento pCR8/GW/TOPO de 2.817 pb, presenta un gen que codifica a la resistencia a espectinomicina. B) Vector de expresión pEarlyGate101 de 12.454 pb, presenta un gen que codifica a la resistencia a kanamicina, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y la secuencia que codifica a la proteína fluorescente YFP. C) Vector de expresión pGWB2 – PSY1 de 17.745 pb, presenta el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, un gen que codifica a la resistencia a kanamicina, un gen que codifica a la resistencia a higromicina (*hptII*) y la secuencia del gen *DcPsy1*. D) Vector de expresión pGWB2 – PSY2 de 18.533 pb, presenta el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, un gen que codifica a la resistencia a kanamicina, un gen que codifica a la resistencia a higromicina (*hptII*) y la secuencia del gen *DcPsy2*.

3.3.- Partidores

Los partidores para amplificar ADNc del gen *DcPsy1* sin codón de *stop* y el gen que codifica a la resistencia a higromicina (*hptII*) fueron diseñados manualmente. El

análisis de los partidores diseñados se realizó mediante el programa OligoAnalyzer 3.1, el cual permitió calcular la temperatura de disociación y descartar la presencia de homo y heterodímeros. Los partidores fueron sintetizados por IDT® y se detallan en la Tabla IV.

Tabla IV.- Lista de partidores utilizados durante el desarrollo del trabajo de este Seminario de Título.

Partidor	Secuencia (5'→ 3')	Descripción
<i>hptII</i> directo	TTTGTGTACGCCCGACAGTC	Permite amplificar 624 pb del gen <i>hptII</i>
<i>hptII</i> reverso	AAGACCTGCCTGAAACCGAAC	
<i>DcLcyb1</i> directo	GGGTTAGCGGTAGCACAAC	Permite amplificar 764 pb del gen <i>DcLcyb1</i>
<i>DcLcyb1</i> reverso	GAGGGAGTACAGGCAGAGG	
<i>DcPsy1</i> directo	ATGCCTTGTAATTTTGCTGTCAGG	Permite amplificar 1.194 pb del gen <i>DcPsy1</i>
<i>DcPsy1</i> reverso	TCTTACAGTAGAAGGGGCAAAAAGA	correspondientes al gen sin el codón de <i>stop</i>
M13F	GTAAAACGACGGCCAG	Partidores utilizados para la
M13R-pUC	CAGGAAACAGCTATGAC	secuenciación de la construcción PCR8 – PSY1

3.4.- Esterilización y siembra de semillas de *D. carota* en medio MS *in vitro*.

Trabajando en condiciones de esterilidad dentro de una cámara de flujo laminar, se sumergieron las semillas de *D. carota* (variedad Nantes) en una solución de captan 2% por 20 min en agitación constante. Posteriormente, se realizaron 3 enjuagues utilizando agua estéril, y las semillas se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio 2,5% donde se incubaron durante 1 hora en agitación. Completado el tiempo de incubación, las semillas se lavaron 3 veces con agua estéril, se secaron en papel absorbente estéril y se depositaron en frascos estériles con medio de germinación *in vitro* (Medio MS con vitaminas 0,44%, sacarosa 2%, myo-inositol 0,01%, Agar – agar

0,7% y pH 5,8). Las semillas estériles depositadas se incubaron por 3 semanas en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz a 22°C.

3.5.- Cultivo líquido de cepas bacterianas de *Agrobacterium tumefaciens*

Los cultivos líquidos de las células de *A. tumefaciens* GV3101 se realizaron mediante la inoculación de una alícuota del stock de bacterias en LB líquido (Tryptona 2% p/v, NaCl 0,8% p/v, Extracto de levadura 0,5% p/v) suplementado con rifampicina a una concentración de 20 µg/mL y gentamicina a 50 µg/mL. El cultivo se mantuvo por 26 h a 28°C en agitación. En el caso de las cepas de *A. tumefaciens* GV3101 pGWB2 – PSY1, pGWB2 - PSY2, pEarlyGate101 y pEarlyGate101 – PSY1 el medio de cultivo líquido se suplementó con kanamicina a 100 µg/mL.

3.6.- Transformación estable de *Daucus carota* mediante *Agrobacterium tumefaciens* y regeneración *in vitro*

La transformación de explantes de *D. carota* se llevó a cabo utilizando el protocolo modificado descrito por Chen y Punja (2002). Se prepararon dos cultivos líquidos de 15 mL, uno de la cepa de *A. tumefaciens* pGWB2 – PSY1 y otro de la cepa pGWB2 – PSY2 y se dejaron creciendo durante 26 h a 28°C. Los cultivos se centrifugaron a 4.000 g por 5 min, se eliminó el sobrenadante y se agregó 30 mL de medio MS líquido suplementado con acetosiringona a 100 µM de y se incubó a 28°C en agitación hasta obtener una D.O₆₀₀ de un valor entre 0,6 y 0,8.

El tejido utilizado para la transformación fueron hipocótilos y epicótilos de 1 cm de plántulas de *D. carota* de 3 semanas de edad provenientes de cultivos *in vitro* de semillas de *D. carota*. El tejido fue cortado en condiciones de esterilidad. Un grupo de estos explantes fue incubado durante 15 minutos en el cultivo de *A. tumefaciens* pGWB2 – PSY1 y otro grupo en el cultivo de *A. tumefaciens* pGWB2 – PSY2. A los explantes se les realizaron pequeñas heridas con un bisturí para favorecer la eficiencia de la infección de *A. tumefaciens*. Los explantes fueron secados en papel absorbente estéril y depositados en placas Petri con medio MS con agar al 0,7% (MS sólido), las que se incubaron a 22°C en oscuridad durante 48 h. Los explantes fueron retirados de las placas de medio MS y se depositaron en placas Petri con medio MS – agar 0,7% suplementado con kanamicina a 25 mg/L y ácido 2,4 diclorofenoxiacético a 1 mg/L (2,4

- D)(Medio MKI). Estas placas se mantuvieron en oscuridad durante 30 días a 22°C. Posteriormente, los explantes se transfirieron a placas Petri con medio MS - agar 0,7% suplementado con kanamicina a 50 mg/L y 2,4 – D a 0,5 mg/L (medio MKII) MKII, donde se mantuvieron por otros 30 días bajo fotoperiodo 16 h, hasta la aparición de embriones inmaduros. Luego, los embriones se transfirieron a placas Petri con medio MS – agar 0,7% suplementado con kanamicina a 100 mg/L (medio MKIII), donde se mantuvieron hasta la aparición de los primeros brotes de plántulas de *D. carota*. Luego de la aparición de los primeros brotes, éstos se traspasaron a frascos Magenta con medio MKIII, donde se mantuvieron hasta que las plántulas alcanzaran un tamaño de 5 cm de alto y con una raíz bien formada. Estas plántulas fueron transferidas a maceteros que contenían una mezcla de tierra de hojas, vermiculita y turba (1:1:1) y se cultivaron en un invernadero a 22°C bajo fotoperiodo de 16 h luz. Debido a que las plántulas en los frascos Magenta se encontraban en un ambiente de alta humedad, al ser transferidas a tierra se cubrieron con frascos transparentes durante dos semanas para mantener las condiciones de humedad. Los frascos se retiraron lentamente para aclimatar las plántulas a la menor humedad del invernadero. Las plantas se regaron 1 vez a la semana con medio Hidropónico (KNO₃ 0,125 mM, Ca(NO₃)₂*4H₂O 0,15 mM, MgSO₄*7H₂O 0,075 mM, KH₂PO₄ 0,05 mM, KCl 5 µM, H₃BO₃ 5 µM, MnSO₄ 1 µM, ZnSO₄*7H₂O 200 nM, CuSO₄ 150 nM, Na₂O₃Si 10 µM, Fe/DTPA 10 µM, pH 6).

3.7.- Extracción de ADN genómico de *Daucus carota* a partir de tejido vegetal

De plantas de *D. carota* que llevaban 3 meses de crecimiento en tierra, se extrajo el ADN genómico de 17 plantas transformadas con la cepa de *A. tumefaciens* pGWB2 – PSY1, 7 plantas transformadas con la cepa de *A. tumefaciens* pGWB2 – PSY2 y 2 plantas silvestres. La extracción de ADN genómico a partir de tejido vegetal se realizó utilizando un protocolo descrito por Doyle y Doyle en 1990. Se utilizaron 100 mg de hojas de *D. carota*, los cuales se molieron en presencia de nitrógeno líquido en morteros previamente esterilizados y enfriados. Se adicionaron 700 µL del buffer CTAB (Bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM y Tris 100 mM pH 8) previamente calentado a 60°C, se homogenizó con el tejido vegetal y se traspasó a un tubo Eppendorf de 2 mL. Se adicionaron 5 µL de β-mercaptoetanol y el homogenizado se incubó durante 15 min a 60°C con agitación cada 5 min. Se agregó un volumen de una solución fría de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló en

vortex brevemente y se centrifugó a 10.000 g durante 10 min. La fase acuosa superior se traspasó a un tubo limpio y se precipitó con un volumen de isopropanol frío durante 30 min a -20°C. Se centrifugó a 10.000 g durante 10 min, y el precipitado se lavó con etanol 75%. Se volvió a centrifugar a 10.000 g durante 5 min, posteriormente el ADN se secó a temperatura ambiente y se suspendió en 30 µL de agua libre de nucleasas. Por último, se determinó la concentración del ADN y las razones 260/280 y 260/230, que indican la pureza del ADN en un espectrofotómetro NanoDrop. El índice 260/280 indica cuan puro se encuentra el ADN con respecto a proteínas que pudieran estar contaminando la muestra, para ADN el índice 260/280 debería estar entre 1,8 y 2,1. Por otro lado el índice 260/230 indica la pureza del ADN con respecto a contaminantes que absorben a 230 nm como compuestos fenólicos y algunas sales, y para un ADN puro el índice 260/230 debería encontrarse entre 1,8 y 2,1.

3.8.- Reacción en cadena de la polimerasa, PCR convencional

Todas las reacciones de PCR realizadas se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µL, que contenía 1 µL de una muestra de ADN genómico a 100 ng/µL de *D. carota*, 1 U de enzima *Taq* ADN polimerasa (New England Biolabs), 2,5 µL de PCR buffer 10x, 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 0,5 µL de partidor directo 10 mM, 0,5 µL de partidor reverso 10 mM y 19,8 µL de agua libre de nucleasas. En todos los casos se realizó una reacción de control negativo, a la cual no se le agregó muestra de ADN.

En el caso del experimento realizado para verificar la transgenie de las plantas de *D. carota* transformadas con los vectores pGWB2 – PSY1 y pGWB2 – PSY2, se utilizaron partidores capaces de amplificar 624 pb del gen *hptII*, gen que codifica a la resistencia a higromicina y que se inserta en el genoma junto al gen de interés. Se utilizó como control positivo ADN plasmidial del vector pGWB2 sin inserto. Para verificar la correcta integridad del ADN genómico extraído, se utilizaron partidores que amplificaran un fragmento de 764 pb del gen de expresión constitutiva *DcLcyb1*, como control positivo, se utilizó ADNc de *D. carota* previamente verificado. La secuencia de los partidores se muestra en la tabla IV y las condiciones de PCR se detallan en la tabla V y VI.

En el caso de las reacciones PCR realizadas para amplificar y verificar la presencia del ADNc del gen *DcPsy1* sin el codón de término de la traducción (*stop*), se

utilizó el partidor *DcPsy1* directo y reverso mostrados en la tabla IV. Las condiciones de PCR se detallan en la tabla VII

Tabla V.- Programa utilizado para la amplificación de un fragmento de 624 pb del gen *hptII*.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación inicial	94	3 min	1
Denaturación	94	40 s	34
Hibridación	54	40 s	
Extensión	72	50 s	
Extensión final	72	10 min	1

Tabla VI.- Programa utilizado para la amplificación de un fragmento de 764 pb del gen *DcLcyb1*.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación inicial	94	3 min	1
Denaturación	94	40 s	34
Hibridación	53	40 s	
Extensión	72	50 s	
Extensión final	72	10 min	1

Tabla VII .- Programa utilizado para la amplificación del ADNc de *DcPsy1* sin el codón de término de la traducción.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación inicial	94	3 min	1
Denaturación	94	40 s	34
Hibridación	54	40 s	
Extensión	72	1.20 min	
Extensión final	72	10 min	1

3.9.- Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis del resultado de las reacciones PCR se realizó en geles de agarosa al 1,5%. Se utilizó el buffer de corrida TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8), y para cargar las muestras, se utilizó un buffer de carga 6X (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilencianol, 15% glicerol) en la proporción 5:1. Para la migración electroforética se utilizó entre 90 voltios durante 55 min para separar las moléculas de ADN. Posteriormente, los geles de agarosa se tiñeron durante 20 min sumergiéndolos en una solución de bromuro de etidio 20 mg/L, se colocaron bajo la luz UV del transiluminador DarkRoom Multigenius Syngene® y se visualizaron y fotografiaron a través del programa Gene Snap® de Syngene®.

3.10.- PCR convencional con la enzima *Pfu* ADN polimerasa para amplificar el ADNc del gen *DcPsy1* sin codón de *stop* y electroforesis

Para amplificar el ADNc del gen *DcPsy1* sin codón de *stop*, primero se verificó que los partidores *DcPsy1* diseñados lograsen amplificar una banda de un tamaño de 1194 pb (tamaño del ADNc de *DcPsy1* sin codón de *stop*) a partir de ADNc de *D. carota* mediante un PCR convencional (sección 3.8). Luego de verificar la funcionalidad de los partidores, la amplificación de *DcPsy1* de *D. carota* se realizó mediante un PCR convencional utilizando la enzima *Pfu* ADN polimerasa (New England Biolabs). Todas las reacciones de PCR llevadas a cabo utilizando la enzima *Pfu* ADN polimerasa se realizaron en un volumen de reacción total de 25 µL, el que contenía 1 µL de una muestra de ADNc a 100 ng/µL, 1,25 U de enzima *Pfu* ADN polimerasa (0,5 µL), 2,5 µL de *Pfu* buffer 10x, 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 0,5 µL de partidor *DcPsy1* directo 10 mM, 0,5 µL de partidor *DcPsy1* reverso 10 mM y 19,5 µL de agua libre de nucleasas. Se realizó una reacción como control negativo a la cual en vez de ADNc se agregó agua libre de nucleasas. El programa de la reacción de PCR con *Pfu* polimerasa se detalla en la tabla VIII. La electroforesis se llevó a cabo de acuerdo a lo explicado en la sección 3.9.

Tabla VIII.- Programa de PCR con *Pfu* polimerasa utilizado para la amplificación del ADNc del gen *DcPsy1* sin codón de *stop*

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación inicial	94	3 min	1
Denaturación	94	40 s	39
Hibridación	54	40 s	
Extensión	72	2.40 min	
Extensión final	72	10 min	1

3.11.- Purificación de bandas desde gel de agarosa

Para extraer y purificar las bandas de ADN desde geles de agarosa, éstas se cortaron del gel utilizando un bisturí y se purificaron mediante el uso del kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se realizó una electroforesis del producto obtenido para verificar el resultado de la purificación.

3.12.- Adición de adeninas a los extremos del producto PCR purificado

El vector pCR8/GW/TOPO presenta la enzima topoisomerasa tipo I unida covalentemente en su sitio de clonamiento múltiple, lo que favorece la ligación de productos PCR que cuenten con adeninas libres en sus extremos 3'. Debido a esto se llevó a cabo una reacción de adición de adeninas al producto de PCR, en un volumen final de 20 µL, que contenía 300 ng del ADN purificado, 1 U de enzima *Taq* ADN polimerasa (New England Biolabs), 2 µL de PCR buffer 10x, 0,4 µL de dATPs 10 mM, y 8 µL de agua libre de nucleasas. La reacción se incubó a 72°C por 30 minutos.

3.13.- Ligación del producto de PCR al vector pCR8/GW/TOPO

Para ligar el fragmento de interés al vector de entrada pCR8/GW/TOPO (figura 3.A), se realizó una reacción que contenía 2 µL del producto PCR purificado al cual se le agregó previamente las adeninas en sus extremos 3', 0,5 µL del vector de entrada y

0,5 µL de una solución salina (NaCl 1,2 M, MgCl₂ 0,06 M). La reacción de ligación se incubó 12 h a temperatura ambiente.

3.14.- Transformación de *E. coli* TOP10

Para la transformación de las bacterias *E. coli* TOP10, se descongeló en hielo una alícuota de células *E. coli* TOP10 quimiocompetente y se mezcló con 3 µL de una reacción de ligación. Se incubó la alícuota en hielo durante 30 min, posteriormente se incubó durante 30 s a 42°C e inmediatamente se depositó en hielo. Luego de 2 min, se mezcló la alícuota con 250 µL de medio LB líquido (Tryptona 2% p/v, NaCl 0,8% p/v, Extracto de levadura 0,5% p/v) y se incubó a 37°C durante 1 h en agitación. Se sembraron entre 100 y 300 µL del cultivo en placas Petri con LB sólido (medio LB - agar 1,6%) suplementado con el antibiótico de selección adecuado al vector incorporado y se incubaron 16 h a 37°C. En el caso del vector PCR8 – PSY1 se suplementó con 100 µl/mL de espectinomicina y en el caso del vector pEarlyGatw101 – PSY1 se suplementó con 100 µl/mL de kanamicina.

3.15.- PCR de colonia

Para determinar si las colonias de células bacterianas transformadas con el vector de interés portaban la construcción esperada, se realizaron reacciones de PCR con los partidores de *DcPsy1* a las colonias crecidas en placas de Petri luego de la transformación. Para esto, en condiciones de esterilidad, se tomó la colonia con un mondadientes estéril y se suspendió en un Eppendorf de 0,2 mL que contenía 25 µL de la misma reacción utilizada para realizar un PCR convencional. Además, se tomó nuevamente la misma colonia y se inoculó en un tubo Falcon con medio LB líquido suplementado con el antibiótico adecuado para propagar la colonia. Finalmente, los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa mediante electroforesis y se tiñeron mediante bromuro de etidio (Sección 3.9).

3.16.- Extracción de ADN plasmidial de células de *E. coli*

La extracción de ADN plasmidial a partir de células de *E. coli* transformadas con el vector de interés, se realizó mediante el uso del E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I (OMEGA), siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.17.- Digestión enzimática para la selección de clones positivos y determinar orientación del ADNc del gen *DcPsy1*

La construcción esperada PCR8 – PSY1, se digirió utilizando las enzimas *HpaI* (Fermentas) y *NdeI* (Fermentas) para comprobar si el fragmento insertado en el vector correspondía al ADNc del gen *DcPsy1* y la orientación en la cual se ligó. La reacción realizada contenía 500 ng de ADN plasmidial de los clones identificados por PCR de colonia, 4µL del buffer tango 10x, 5U de *HpaI* y *NdeI* y agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 20 µL. La mezcla se incubó por 12 horas a 37°C. Se realizó a su vez un control negativo que no contenía ADN plasmidial. Los productos de la digestión se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (sección 3.9).

3.18.- Secuenciación del vector PCR - PSY1

El ADN plasmidial de los clones positivos para el vector PCR8 – PSY1 identificados mediante los análisis de PCR de colonia y digestión enzimática fueron secuenciados por la empresa MacroGen Co. (USA), usando los partidores del fago M13F (-20) (directo) y M13R-pUC (-40) (reverso) para pCR8, Tabla IV.

3.19.- Análisis *in silico* de la secuencia del ADNc del gen *DcPsy1*

Utilizando el software online WorkBench 3.2 (<http://workbench.sdsc.edu>). Se comparó la secuencia de nucleótidos obtenida de la secuenciación con la secuencia del gen *DcPsy1* reportada por Just y cols. (2007) (número de acceso DQ192186). Además, utilizando el mismo software online, se comparó las secuencias de aminoácidos deducidas de ambos genes.

Por medio del software online ChloroP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk>), se analizó el posible organelo al cual la proteína PSY1 es destinada. Este análisis se realizó con la secuencia obtenida por secuenciación y la reportada en literatura. Además, se llevó a cabo el mismo procedimiento, pero utilizando ambas proteínas sin la secuencia del péptido señal predicho por el software.

Finalmente, por medio del software online InterPro 61.0 (<https://www.ebi.ac.uk>), se realizó un análisis de los posibles dominios que pudiesen presentar las proteínas codificadas por ambas secuencias. El vector obtenido se llamó PCR8 – PSY1

3.20.- Recombinación de la construcción PCR8 – PSY1 con el vector de destinación pEarlyGate101 mediante recombinación Gateway

El vector de destinación pEarlyGate101 (Figura 3.B) posee bordes LB y RB que flanquean la región que se insertará en el genoma de la planta a transformar. Dentro de esta zona se encuentran los sitios de recombinación attR1 y attR2 flanqueando al gen *ccdB* y *CmR*, y río abajo se encuentra el gen reportero YFP. La recombinación de los sitios attL1 y attL2 presentes en el vector de entrada con los sitios attR1 y attR2 permiten reemplazar el gen *ccdB* y *CmR* por el fragmento previamente insertado en el vector de entrada.

La recombinación se realizó en un volumen de final de reacción de 8 µL, y cada reacción contenía 100 ng del vector PCR8 – PSY1, 250 ng del vector de pEarlyGatw101, 2 µL del Mix de la enzima LR Clonasa (Invitrogen) y agua libre de nucleasas hasta completar los 8 µL. La reacción se incubó a 25°C durante la noche y luego se inactivó utilizando un 1 µL de Proteínasa K a 37°C por 10 min.

3.21.- Transformación de *E. coli* TOP10 con el vector pEarlyGate101 – PSY1 y selección de clones positivos

Se transformaron células de *E. coli* TOP10 quimiocompetentes utilizando 2 µL del vector pEarlyGate101 – PSY1 de la misma forma en la que se detalla en la sección 3.14. Los clones resultantes de la transformación, se analizaron mediante PCR de colonias amplificando el gen *DcPsy1* y luego, se realizó una digestión enzimática del ADN plasmidial de los clones positivos utilizando la enzima *BcuI* (Fermentas) en una reacción de un volumen final de 20 µL. La reacción contenía 2 µL del buffer tango 10x, 500 ng del ADN plasmidial, 5 U de *BcuI* y 12 µL de agua libre de nucleasas. El resultado final se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa. El vector resultante se llamó pEarlyGate101 – PSY1

3.22.- Preparación de cepas bacterianas de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 quimiocompetentes y transformación con el vector pEarlyGate101 – PSY1

Para la obtención de células e *A. tumefaciens* quimiocompetentes, se utilizó una alícuota de células de *A. tumefaciens* GV3101 stock, la cual se inoculó en medio LB

líquido suplementado con rifampicina a 20 mg/L y gentamicina a 100 mg/L, y se incubó a 28°C en agitación constante hasta que el cultivo alcanzase una D.O₆₀₀ entre 0,3 a 0,5. Posteriormente, el cultivo se incubó 10 min en hielo, para luego ser centrifugado a 3.000 g durante 20 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante, y el precipitado de células se resuspendió en 1 mL de una solución estéril de CaCl₂ 20 mM. Las células quimiocompetentes de *A. tumefaciens* fueron almacenadas en alícuotas de 100 µL cada una a -80°C.

Para la transformación de células de *A. tumefaciens*, se descongeló en hielo una alícuota de *A. tumefaciens* GV3101 quimiocompetente y se mezcló con 250 ng del vector de pEarlyGate101 – PSY1. La alícuota se sumergió en nitrógeno líquido durante 5 min y luego se descongeló a temperatura ambiente por 15 min. Se adicionó 1 mL de LB líquido y las células se incubaron a 28°C por 3 h. Se sembraron entre 100 y 300 µL del cultivo en placas Petri con medio LB - agar 1,7% suplementado con rifampicina 10 µg/mL, gentamicina 50 µg/mL y kanamicina 100 µg/mL, y las placas se incubaron durante 48 h a 28°C. Posteriormente, se realizó un PCR de colonia con los partidores de *DcPsy1* para verificar que los clones tuviesen incorporado el vector con el inserto.

3.23.- Transformación transitoria de hojas de *Nicotiana tabacum*

El vector pEarlyGate101 – PSY1 presenta la secuencia codificante de la proteína PSY1 sin codón de *stop* fusionada a la secuencia codificante de la proteína fluorescente YFP. Por lo tanto, para visualizar a que compartimiento celular la proteína PSY1 es dirigida, se transformaron transitoriamente hojas adultas de *Nicotiana tabacum* para observarlas bajo microscopio de epifluorescencia. Se prepararon cultivos de *A. tumefaciens* GV3101 pEarlyGate101 – PSY1 en medio MS líquido suplementado con acetosiringona a 100 µM. Se procedió a infiltrar las células de *A. tumefaciens* en hojas de *N. tabacum*. La infiltración se realizó utilizando una jeringa de 5 mL cargada con el cultivo de *A. tumefaciens* y presionándola suave pero firmemente contra la cara abaxial de las hojas hasta observar la infiltración de una amplia zona de la hoja. Las plantas infiltradas de esta forma se mantuvieron durante 3 días a 22°C en fotoperiodo de 16 h hasta la recolección del tejido.

3.24.- Microscopía de epifluorescencia

Para observar la fluorescencia de YFP, se recolectó tejido a partir de las hojas de *N. tabacum* transformadas transitoriamente y se les realizó el proceso de “peeling” que consiste en remover solamente la epidermis de las hojas. Las muestras se montaron en un porta objetos y se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia invertido Olympus IX70 con un aumento de 200 veces (objetivo 20x) utilizando los filtros de fluorescencia FITC para YFP, que excita en el azul (478-495 nm) y emite en el verde (510-555 nm) y Cy3 para clorofila, que excita en verde (530-560 nm) y emite en rojo (573-648 nm).

Resultados

4.- Obtención de plantas transgénicas de *D. carota* para los genes *DcPsy1* y *DcPsy2*

4.1.- Transformación estable de explantes de *Daucus carota* con los genes *DcPsy1* y *DcPsy2*.

Con el fin de obtener un grupo de explantes que sobreexpresen el gen *DcPSY1* y otro grupo que sobreexpresen el gen *DcPsy2* para a futuro evaluar si existe un aumento en la cantidad de carotenoides de la planta al sobreexpresar dichos genes. Se transformaron 1178 explantes de *D. carota* mediante el uso de cepas de *A. tumefaciens* que portan el vector pGWB2 – PSY1 y 1094 explantes con agrobacterium que portan el vector pGWB2 – PSY2 (vectores generados previamente en el laboratorio). Además, se regeneró *in vitro* 246 explantes silvestres.

Una vez realizado el procedimiento de transformación (sección 3.6), los explantes se colocaron en placas con medio MS - agar 0,7% y se incubaron durante 2 días en oscuridad para favorecer la infección de agrobacterium. Posteriormente los explantes se enjuagaron, limpiaron y trasladaron a placas con el medio MKI para iniciar el proceso de embriogénesis somática (figura 4.A, B y C), donde permanecieron por 30 días. Después de lo cual se colocaron en placas con medio MKII (figura 4.D, E y F) donde permanecieron por 30 días adicionales. Posteriormente, se trasladaron a placas con el medio MKIII (figura 4.G, H e I) hasta el desarrollo de los embriones. En la figura 5.A, B y C se pueden apreciar embriones maduros y desarrollo inicial de plántulas después de 3 meses de cultivo *in vitro*. Las plántulas diferenciadas (figura 5.D, E y F) se trasladaron a un frasco magenta con medio MKIII para permitir su elongación y una vez que las plántulas alcanzaron un tamaño de 5 cm y generaron una raíz bien definida (figura 5.G, H e I), se trasladaron a maceteros en tierra (Figura 5.J, K y L).

Al primer mes de cultivo *in vitro* (figura 4.D, E y F), se observó que los explantes silvestres a diferencia de los explantes que fueron transformados con los genes *DcPsy1* y *DcPsy2* presentaban un engrosamiento temprano de su tejido y un desarrollo más rápido de los primeros embriones (2 semanas antes que los explantes transformados) Además de que el número de explantes vivos en las placas de los

explantes silvestres disminuye a 231, mientras que el número de explantes provenientes de las transformaciones con *DcPsy1* y *DcPsy2* disminuye a 932 y 857 respectivamente. Esto se debe a que los explantes van muriendo a causa del antibiótico, por el estrés que les produce ser cortados o por la actividad de agrobacterium. A los 2 meses de cultivo (figura 4.G, H y I), se observó que los embriones generados en los explantes transformados presentaban una tonalidad amarilla oscuro en comparación a la amarilla clara que los embriones silvestres tenían. Esta apreciación fue más evidente en etapas posteriores de incubación en el medio MKIII (figura 5.A, B y C), ya que los embriones provenientes de explantes transformados presentaron una coloración amarilla anaranjada a diferencia de la tonalidad amarillo verdosa de los embriones silvestres. Durante el estadio de plántulas (figura 5.D, E y F), un 21% de las plántulas *DcPsy1* de un total de 176 y un 53% de las plántulas *DcPsy2* de un total de 132 presentaron una coloración amarilla – anaranjado a lo largo del hipocótilo y los cotiledones. Mientras que el 79% de las plántulas *DcPsy1*, el 47% de las plántulas *DcPsy2* y el 100% de las plántulas silvestres (de un total de 152 plántulas silvestre) presentaron los cotiledones de coloración verde. En el caso de las plantas, antes de ser trasplantadas a maceteros en tierra (figura 5.G, H e I), se pudo observar que el 17% de las plantas *DcPsy1* de un total de 99 presentaron un leve desarrollo de la raíz modificada. En el caso de las plantas provenientes de explantes transformados con el gen *DcPsy2*, se observó en un 5% del total de 60 plantas una raíz modificada engrosada de color anaranjado. El 83% de las plantas *DcPsy1*, el 95% de las plantas *DcPsy2* y el 100% de las plantas silvestres (de un total de 72 plantas silvestres) no tuvieron un desarrollo de la raíz modificada en esa etapa del cultivo. En las plantas en tierra (Figura 5.J, K y L), no se observaron diferencias fenotípicas evidentes en la zona aérea entre las plantas transformadas y las silvestres. No se midió el largo de la raíz o el nivel de desarrollo de la raíz modificada en tierra porque eso implica sacrificar las plantas, las cuales se necesitan para análisis posteriores en otros trabajos.

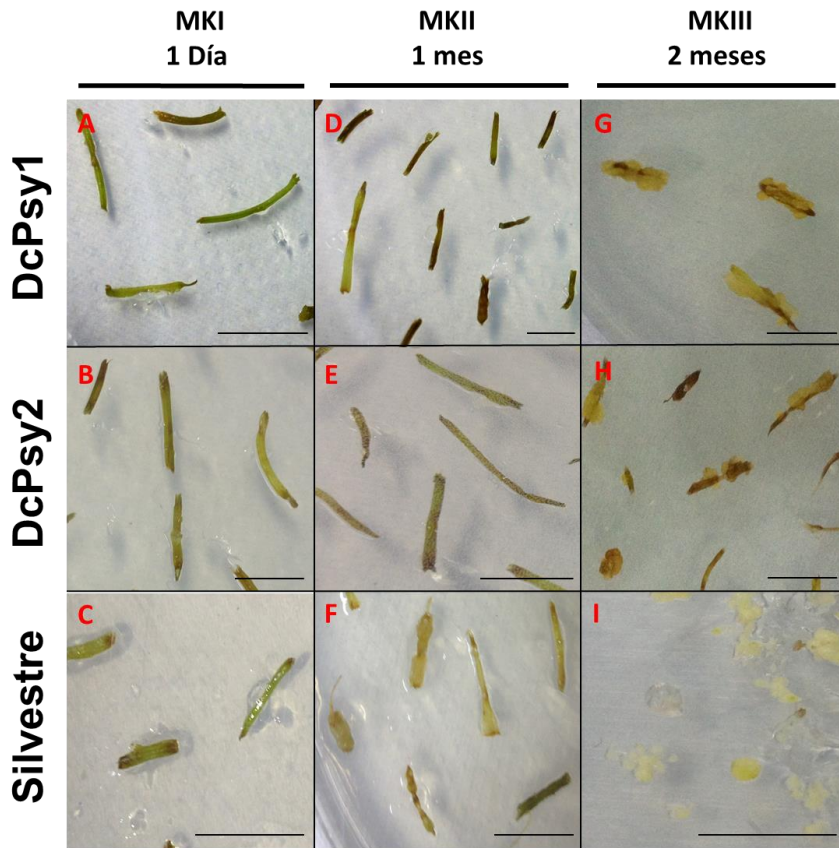


Figura 4.- Fotografías de la regeneración *in vitro* de los explantes de *D. carota*. (A), (B) y (C) son explantes transformados con el gen *DcPsy1*, *DcPsy2* e hipocótilos silvestres (control), respectivamente en el primer día de cultivo en medio MKI. (D), (E) y (F) son explantes transformados con el gen *DcPsy1*, *DcPsy2* e hipocótilos silvestres respectivamente, al primer mes de cultivo *in vitro* (día 1 de cultivo en medio MKII). (G), (H) e (I) son explantes con el gen *DcPsy1*, *DcPsy2* e hipocótilos silvestre respectivamente a los 2 meses de cultivo *in vitro* (día 1 de cultivo en medio MKIII). Las barras negras indican el tamaño de 1 cm.

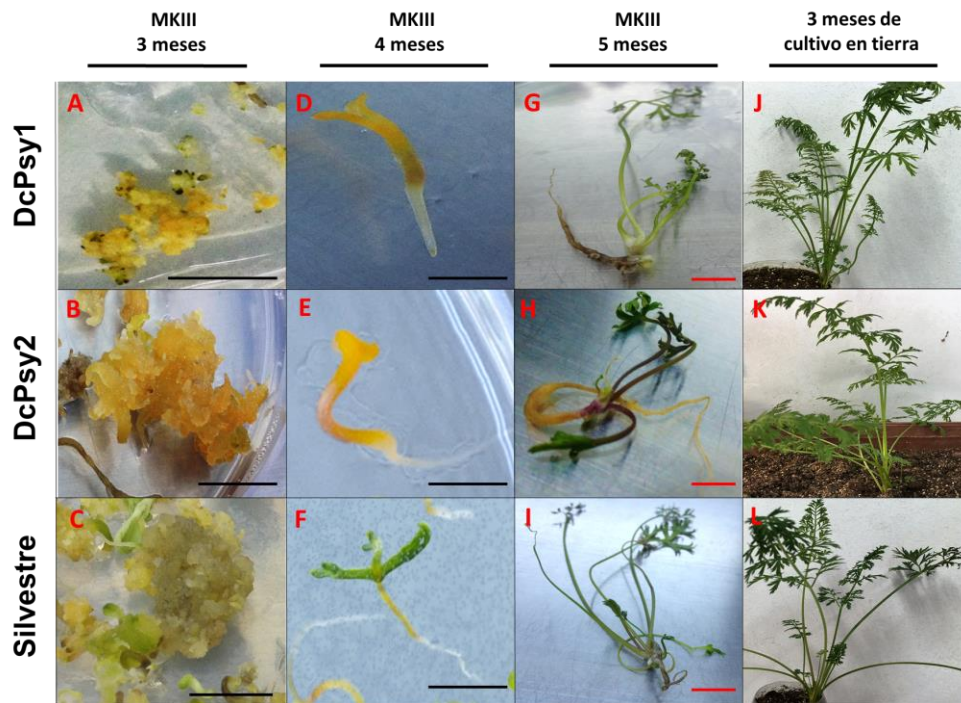


Figura 5.- Fotografías de la regeneración de explantes de *D. carota*. (A), (B) y (C) son embriones provenientes de explantes transformados con el gen *DcPsy1*, *DcPsy2* y embriones silvestres (control), respectivamente a los 3 meses de cultivo *in vitro*. (D), (E) y (F) son plántulas provenientes de los eventos de transformación con el gen *DcPsy1*, *DcPsy2* y plántulas silvestres, respectivamente a los 4 meses de cultivo *in vitro*. (G), (H) e (I) son plantas provenientes de explantes transformados con el gen *DcPsy1*, *DcPsy2* y plantas silvestres, respectivamente a los 5 meses de cultivo *in vitro* listas para traspasar a cultivo en tierra. (J), (K) y (L) son plantas de 3 meses en tierra. Las barras negras indican el tamaño de 0,5 cm y las barras rojas 1,5 cm.

4.2.- Análisis de la transgénesis de las líneas de *Daucus carota* transformadas con los vectores pGWB2 – PSY1 y pGWB2 – PSY2 mediante PCR

Para poder realizar posteriores estudios a las plantas transformadas con los vectores pGWB2 – PSY1 y pGWB2 – PSY2, fue necesario comprobar si son plantas transgénicas, ya que si bien, se cultivaron en medios con agente de selección, pueden obtenerse falsos positivos. Para ello, se extrajo el ADN genómico de 17 líneas transformadas con el vector pGWB2 – PSY1, 7 transformadas con el vector pGWB2 – PSY2 y una planta silvestre con el fin de realizar análisis por PCR. Para verificar la integridad del ADN extraído, se realizó PCR utilizando partidores que permitiesen

amplificar un fragmento de 764 pb del gen *Lcyb* que codifica a la enzima licopeno β - ciclasa, involucrada en la síntesis del β - caroteno. Para verificar la transgenie de las plantas, se utilizaron partidores que amplifican un fragmento de 624 pb del gen *hptII*, que codifica a la resistencia a higromicina. Como se puede observar en la figura 6, de las plantas transformadas con el vector pGWB2 - PSY1, se obtuvo que 16 líneas de las 17 analizadas dieron positivo para la amplificación del fragmento del gen *Lcyb*, mientras que, para el análisis de la transgenie, 11 de 17 líneas amplificaron el fragmento del gen *hptII* (figura 6).

Por otro lado, de las 7 líneas analizadas de las plantas que fueron transformadas con el vector pGWB2 – PSY2, se obtuvo que las 7 líneas entregaban un resultado positivo tanto para la amplificación del fragmento del gen *Lcyb* como para la amplificación del fragmento del gen *hptII* (figura 7). En el caso de del ADN_g extraído de la planta silvestre, se obtuvo que se amplificó con éxito un fragmento del gen de *Lcyb*, pero negativo para la amplificación del fragmento del gen *hptII* (carril wt de la figura 6). Lo que permite afirmar que las líneas que dieron positivo para la amplificación del fragmento de *hptII* son efectivamente transgénicas.

Esto permite concluir que se obtuvieron satisfactoriamente 11 líneas transgénicas para *DcPsy1* y 7 para *DcPsy2* que serán usadas para análisis funcionales y de expresión.

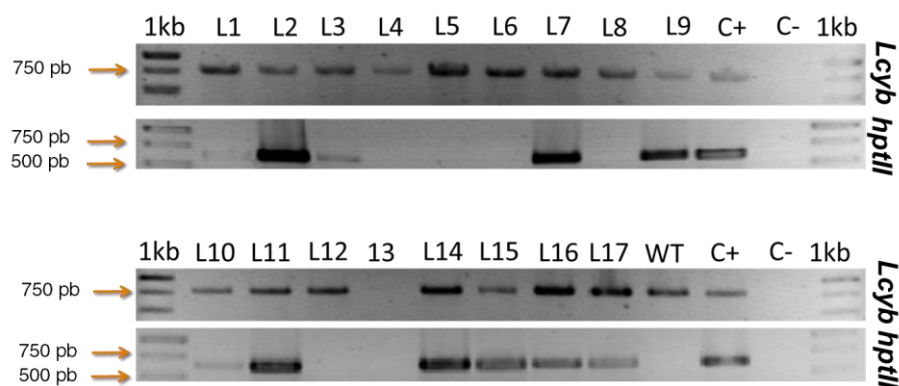


Figura 6.- Amplificación de fragmentos de los genes *Lcyb* y *hptII* a partir de ADNg de plantas transformadas con el vector pGWB2 – PSY1. Los carriles marcados desde L1 hasta L17 corresponden a las plantas transformantes con el vector pGWB2 – PSY1. WT: PCR del ADNg de la planta silvestre. El control positivo (C+) en el caso de la reacción con partidores de *Lcyb* corresponde a ADNc de *D. carota* verificado y en el caso de la reacción de PCR con partidores de *hptII* el control positivo corresponde a el vector pGWB2. El control negativo para todos los casos (C-) corresponde a una reacción PCR sin material genético. El marcador de peso molecular (1kb) corresponde al marcador GeneRuler™ 1kb DNA Ladder.

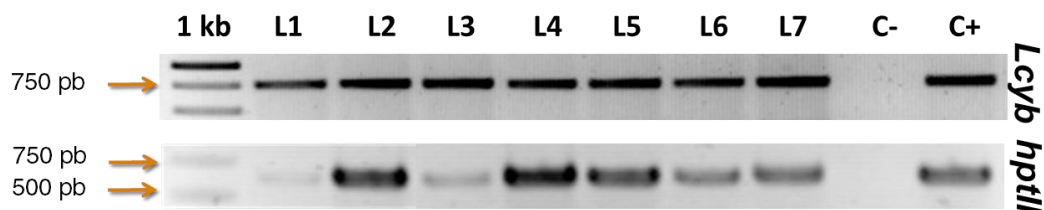


Figura 7.- Amplificación de fragmentos de los genes *Lcyb* y *hptII* a partir de plantas transformantes con el vector pGWB2 – PSY2. Los carriles marcados desde L1 hasta L7 corresponden a las plantas transformadas con el vector pGWB2 – PSY2. El control positivo (C+) en el caso de la reacción con partidores de *Lcyb* corresponde a ADNc de *D. carota* verificado y en el caso de la reacción de PCR con partidores de *hptII* el control positivo corresponde a el vector pGWB2. El control negativo para todos los casos (C-) corresponde a una reacción PCR sin material genético. El marcador de peso molecular (1kb) corresponde al marcador GeneRuler™ 1kb DNA Ladder.

5.- Localización subcelular de la proteína DcPSY1.

5.1.- Amplificación del ADNc del gen *DcPsy1* de *Daucus carota* sin codón de término de la traducción y su purificación

Para poder realizar el análisis de localización subcelular de la proteína PSY1, fue necesario generar una construcción que permitiese la expresión de una proteína fusión entre PSY1 y una proteína fluorescente. Para ello, primero se diseñaron partidores que permitiesen amplificar el ADNc del gen *DcPsy1* sin codón de término de la traducción (*stop*) (sección 3.3). Posteriormente, se realizó una reacción de PCR convencional con *Taq* polimerasa con el fin de verificar si los partidores diseñados podían amplificar un fragmento del tamaño esperado de 1.194 pb (tamaño del ADNc del gen *DcPsy1* sin codón de *stop*) a partir de ADNc de *Daucus carota*.

Como resultado, se obtuvo una amplificación de un fragmento de un tamaño de entre 1.000 y 1.500 pb y de un fragmento de posible unión inespecífica de los partidores de 1.500 pb, cuya amplificación fue poco favorecida en comparación a la del fragmento de aproximadamente 1.200 pb (figura 8).

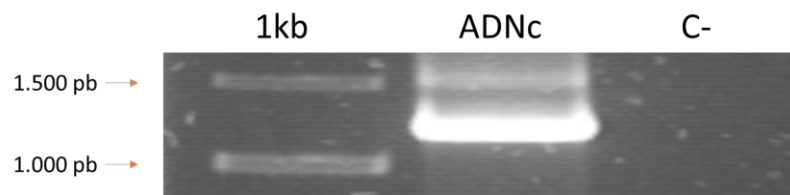


Figura 8.- Amplificación por PCR del ADNc del gen *DcPsy1* sin codón de *stop*. El carril ADNc corresponde a la amplificación del gen *DcPsy1* sin codón de *stop*. El control negativo (C-) es la reacción PCR sin ADNc. El marcador de peso molecular (1kb) corresponde al marcador GeneRuler™ 1kb DNA Ladder.

Una vez corroborado el funcionamiento de los partidores diseñados para la amplificación del ADNc del gen *DcPsy1* sin codón de *stop*, se realizó un PCR con *Pfu* polimerasa (sección 3.10) con el fin de amplificar con una mayor fidelidad el fragmento de interés, ya que la enzima *Pfu* polimerasa presenta una tasa de error ($2,6 \times 10^{-6}$ errores por nucleótido por ciclo. Lundberg y cols., 1991) menor que la de la *Taq* polimerasa.

Como resultado, se obtuvo que se amplificó una banda de un tamaño de entre 1.000 y 1.500 pb al igual que cuando se amplificó con la enzima *Taq* polimerasa (figura 6), pero no se obtuvo la banda de 1.500 pb que se encontró anteriormente.

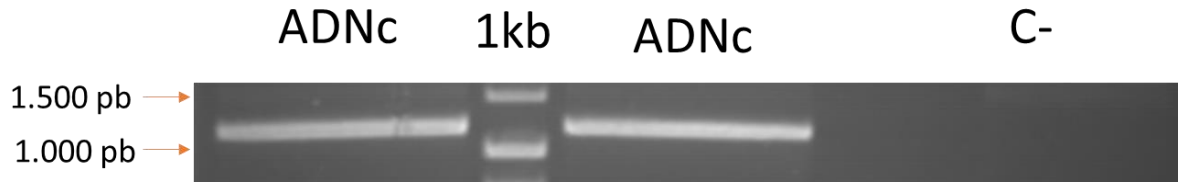


Figura 9.- Amplificación por PCR del ADNc del gen *DcPsy1* sin codón de *stop* utilizando *Pfu* polimerasa. Los carriles ADNc corresponden a la amplificación del ADNc del gen *DcPsy1* sin codón de *stop* usando *Pfu* polimerasa. El control negativo (C-) es la reacción PCR sin ADNc. El marcador de peso molecular (1kb) corresponde al marcador GeneRuler™ 1kb DNA Ladder.

Habiendo obtenido un resultado exitoso, se procedió a purificar las bandas obtenidas de esta última amplificación (sección 3.11), el producto de la purificación se utilizó para ligarlo al vector pCR8/GW/TOPO.

5.2.- Generación del vector PCR8 – PSY1

El vector pCR8/GW/TOPO (figura 3.A) tiene un tamaño de 2.817pb y es un vector de entrada que es usado en reacciones de recombinación Gateway con vectores de destinación, como es el caso del vector pEarlyGate101, el cual presenta la peculiaridad de expresar constitutivamente una proteína fusión entre el producto génico de interés y la proteína YFP. Es por esto, que se ligó el ADNc del gen *DcPsy1* purificado en el paso anterior en el vector pCR8/GW/TOPO según lo detallado en la sección 3.13. Se transformaron colonias de *E. coli* TOP10 quimiocompetentes con el vector PCR8 – PSY1 de la forma en la que se detalla en la sección 3.14. Posteriormente se realizó un PCR de colonia a las colonias transformantes para verificar que el vector diseñado estuviese presente. Se obtuvo como resultado que 10 de las 15 colonias analizadas amplificaron el ADNc del gen *DcPsy1* (figura 10). A estas colonias que dieron un resultado positivo se les extrajo el ADN plasmidial tal cual se detalla en la sección 3.16 para un posterior análisis con enzimas de restricción.

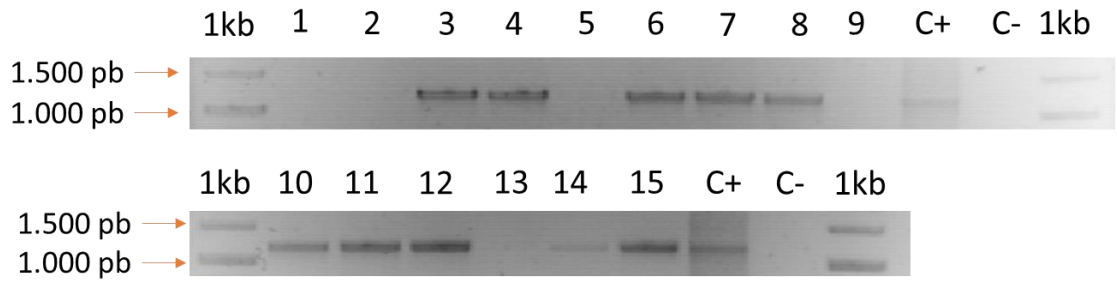


Figura 10.- Amplificación del ADNc del gen *DcPsy1* en colonias de *E. coli* transformadas con el vector PCR8 – PSY1. Los carriles correspondientes a la reacción de PCR de las colonias están marcados con números del 1 al 15. En el control positivo (C+) se utilizó una alícuota del ADNc del gen *DcPsy1* purificado de una banda de gel de agarosa. El control negativo para todos los casos (C-), corresponde a una reacción PCR sin material genético. El marcador de peso molecular (1kb) es el marcador GeneRuler™ 1kb DNA Ladder.

5.3.- Análisis de restricción enzimático del vector PCR8 – PSY1

Para poder dilucidar si el gen *DcPsy1* se ligó al vector pCR8/GW/TOPO en el sentido requerido para los próximos experimentos, fue necesario realizar un análisis de restricción enzimática al ADN plasmidial de las colonias de *E. coli* positivas para el vector PCR – PSY1. Esto se realizó de la manera en la que se detalla en la sección 3.17. Se utilizaron las enzimas *HpaI* y *NdeI*, la primera corta dentro del vector y la segunda corta dentro del gen *DcPsy1* generando dos fragmentos de distintos tamaños. El tamaño de los fragmentos que se generarían si el inserto se encontrara insertado en sentido o antisentido se muestran en la tabla IX.

Tabla IX.- Tamaños de fragmentos generados al realizar una digestión enzimática del vector PCR – PSY1 con las enzimas *HpaI* y *NdeI*.

Vector PCR8 – PSY1	Fragmento 1 (pb)	Fragmento 2 (pb)
Inserto en sentido	1.297	2.714
Inserto en antisentido	257	3.754

Del ADN plasmidial de las 10 colonias analizadas, se obtuvo que el ADNp de 4 colonias (colonia 4, 6, 10 y 12), presentó el inserto *DcPsy1* en dirección sentido (figura 11). No se logran apreciar bien las bandas de 257 pb debido a la difusión de las mismas.

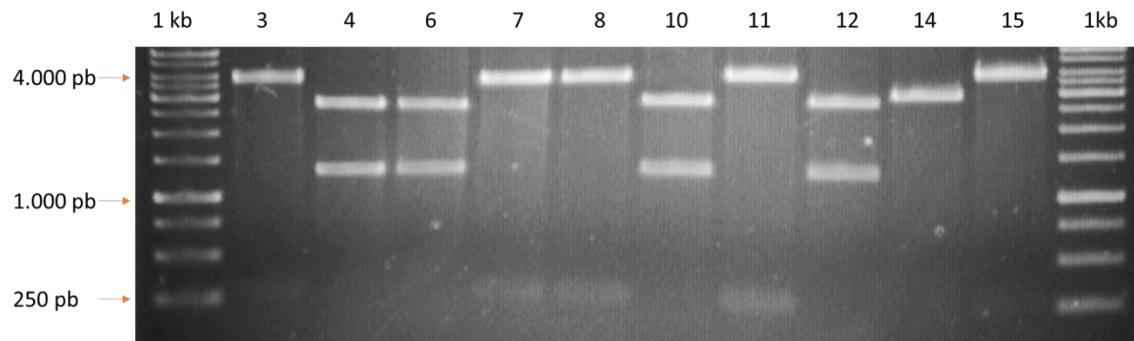


Figura 11.- Digestión enzimática con las enzimas *HpaI* y *NdeI* realizada al ADNp de las colonias PCR8 – PSY1. Los carriles marcados con 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14 y 15 corresponden a las digestiones enzimáticas del ADNp de los clones seleccionados. El marcador de peso molecular (1kb) es el marcador GeneRuler™ 1kb DNA Ladder. Los fragmentos esperados en la construcción que presente el inserto en sentido son de un tamaño de 1.297 y 2.714 pb. En el caso de que el inserto esté ligado en antisentido, los tamaños de los fragmentos separados son de 257 y 3.754 pb.

5.4.- Secuenciación del vector PCR8 – PSY1 y análisis *in silico* del gen *DcPsy1*

Para estar completamente seguros que el fragmento ligado al vector PCR8 correspondía al ADNc del gen *DcPsy1* sin codón de *stop* y que éste no presentase mutaciones, se envió a secuenciar el vector PCR8 – PSY1 perteneciente a 3 (clones 4, 6 y 12) de los 4 clones de *E. coli* en los que el análisis de restricción enzimática con *HpaI* y *NdeI* dio un resultado satisfactorio. El resultado arrojado de la secuenciación se comparó con el marco de lectura abierto de la secuencia de *DcPsy1* (código de acceso DQ1912186 en la base de datos de NCBI) por medio del software online WorkBench 3.2 (<http://workbench.sdsc.edu>) (figura 12).


```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100      110      120
PSY1  MACNFVAVRVIYYPKIEHGVSVLNTNRSRKSFRFSCRVMKLGSTGVSVAANPVRTSEERVVEVVLKQAALVREEKRSRGLCLDTKRTGSKSFDKSENDDAGMKSWNLLNEAYDRGCEVCAE
Seq   MACNFVAVRVIYYPKIEHGVSVLNTNRSRKSFRFSCRVMKLGSTGVSVAANPVRTSEERVVEVVLKQAALVREEKRSRGLCLDTKRTGSKSFDKSENDDAGMKSWNLLNEAYDRGCEVCAE
      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100      110      120
PSY1  YAKTFYLGTLTLLMTPERRRAVWAIYVWCRRTDELVDGPNASHITPKALDRWEKRLNDFDGGPYDMYDAALADTVSTYPVDIQPFKMDIDGMRMDLKKSRYQTFDELYLYCYVAGTVGLM
Seq   YAKTFYLGTLTLLMTPERRRAVWAIYVWCRRTDELVDGPNASHITPKALDRWEKRLNDFDGGPYDMYDAALADTVSTYPVDIQPFKMDIDGMRMDLKKSRYQTFDELYLYCYVAGTVGLM
      130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
PSY1  SVFVVGIAPEKATTESVYSAALALGIANQLTNIIRDVGEDARRGRIYLPQEELKLAGITPEYIFKGVTDKWRFSFMKGQIKRAMFFDEAEKGVAEKSSASRWPVWASLLLYKQILDAL
Seq   SVFVVGIAPEKATTESVYSAALALGIANQLTNIIRDVGEDARRGRIYLPQEELKLAGITPEYIFKGVTDKWRFSFMKGQIKRAMFFDEAEKGVAEKSSASRWPVWASLLLYKQILDAL
      250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
PSY1  EANDYDNFTKRAYVKGAKKLVSLPLAYSRALFAPSTVR
Seq   EANDYDNFTKRAYVKGAKKLVSLPLAYSRALFAPSTVR
      250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
PSY1  EANDYDNFTKRAYVKGAKKLVSLPLAYSRALFAPSTVR
Seq   EANDYDNFTKRAYVKGAKKLVSLPLAYSRALFAPSTVR
      370     380     390
PSY1  EANDYDNFTKRAYVKGAKKLVSLPLAYSRALFAPSTVR
Seq   EANDYDNFTKRAYVKGAKKLVSLPLAYSRALFAPSTVR
      370     380     390

```

Figura 13.- Alineamiento de aminoácidos de la proteína que codifica el gen *DcPsy1* reportado en la literatura y deducidos desde la secuencia (Seq) obtenida por secuenciación. “.” significa que hay match entre los aminoácidos de ambas proteínas. Los aminoácidos resaltados en rojo son aquellos donde no hay match. “.” y los aminoácidos resaltados en verde indican que es un cambio conservativo. Existe un 99% de identidad entre ambas secuencias proteicas. Se obtuvo el mismo resultado con los tres clones seleccionados.

Del alineamiento de aminoácidos de ambas secuencias proteicas, se obtuvo que existe un 99% de identidad entre ellas, siendo 4 los aminoácidos en los que difieren. Estos cambios de aminoácidos son leucina 22 por fenilalanina (cambio conservativo), arginina 74 por glicina, arginina 85 por glutamina (cambio conservativo) y treonina 86 por arginina. Estas 4 diferencias reportadas en la secuencia proteica es menor a las 16 diferencias reportadas por la secuencia de ácidos nucleicos entre el gen clonado y el reportado. Estos estudios permiten afirmar que se clonó efectivamente el ADNc sin codón de *stop* del gen *DcPsy1*. El vector generado PCR8 – PSY1 se muestra en la figura 14.

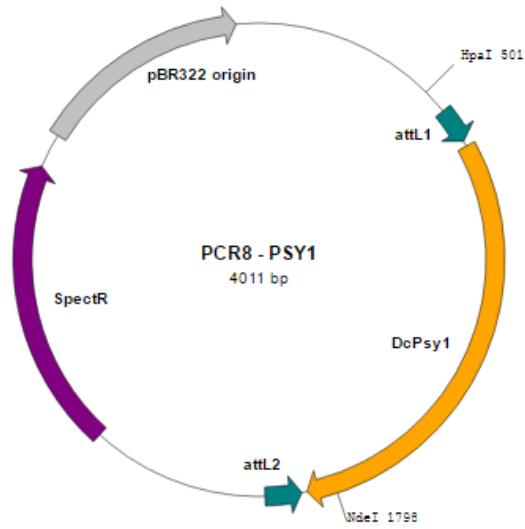


Figura 14.- Representación de vector generado al clonar el gen *DcPsy1* en el vector pCR8/GW/TOPO. El vector cuenta con un gen que confiere resistencia a espectinomicina, un origen de replicación tipo pBR322, los sitios attL, el gen de interés y sitios de corte únicos para las enzimas *HpaI* y *NdeI*, la primera enzima reconoce una secuencia dentro del vector y la segunda enzima una secuencia dentro del gen de interés.

5.5.- Análisis *in silico* de la localización subcelular de DcPSY1.

Dados los 4 cambios de aminoácidos que se obtuvieron en los primeros 90 aminoácidos, se decidió estudiar *in silico* con el fin de ver si esos cambios afectaban la identidad del péptido señal o el dominio N-terminal de la proteína. Para lo primero se utilizó el software online ChloroP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk>), el cual busca en su base de datos proteínas que se conoce hacia que compartimiento van y compara la secuencia de sus péptidos señal con la de la proteína de interés. Se realizó un análisis de la secuencia proteica de la proteína PSY1 que codifica el gen *DcPsy1* descrito en literatura (código de acceso DQ1912186 en NCBI) y la proteína que codifica el *DcPsy1* que se secuenció. Además, se realizó un análisis de ambas secuencias sin la región de 35 aminoácidos que el programa predijo como péptido señal.

Al analizar ambas secuencias completas, se obtuvo que ambas probablemente presentasen un péptido señal de 35 aminoácidos que señalizaba para cloroplasto (tabla X). Por otro lado, al analizar ambas secuencias sin el péptido señal de 35

aminoácidos predicho por el programa, el resultado para péptido señal fue negativo. Esto permitió decir que en base a análisis *in silico* las diferencias en aminoácidos no estarían interrumpiendo ni cambiando la función del péptido señal.

Tabla X.- Resultados del análisis *in silico* en el software ChloroP 1.1 de las secuencias proteicas codificadas por el gen *DcPsy1* descrito en literatura y el secuenciado.

Secuencia	Tamaño (aá)	Puntuación	Cloroplasto	Tamaño péptido señal (aá)
PSY1 completa	398	0,541	Sí	35
PSY1 sin PS	363	0,462	No	-
PSY1 (seq) completa	398	0,547	Sí	35
PSY1 (seq) sin PS	363	0,460	No	-

PSY1, se refiere a la proteína codificada en el gen *DcPsy1* descrito en literatura. PSY1 (seq), es el análisis de la secuencia proteica codificada en el gen *DcPsy1* secuenciado. Completa, se refiere a toda la secuencia proteica. Sin PS, es la secuencia proteica sin el péptido señal de 35 aminoácidos predicho. Puntuación, es el puntaje que el programa otorga al final de los cálculos, el valor va de 0 a 1 y mientras más alto más probabilidades hay de que se dirija a cloroplasto la proteína. Cloroplasto, se refiere a si el péptido señal dirige o no a dicho compartimento.

En el caso del análisis de los dominios presentes en las proteínas, se utilizó el software online de predicción InterPro 61.0 (www.ebi.ac.uk/), el cual compara las secuencias proteicas de las proteínas de interés y las compara con secuencias y dominios de función conocida en su base de datos. Como resultado, se obtuvo que ambas secuencias proteicas presentan los mismos dominios fitoeno, isopreno y trans-isoprenil pirofosfato sintasa, dominios que les confieren utilidad en la ruta de biosíntesis de carotenoides (figura 15).

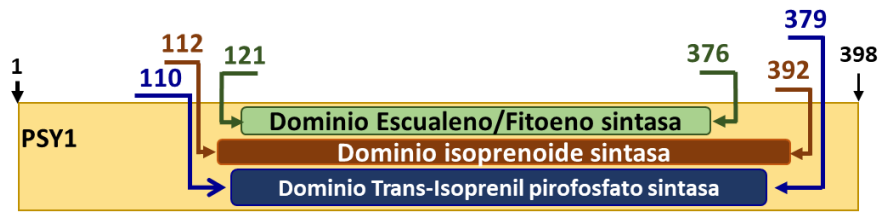


Figura 15.- Representación de los dominios presentes en la proteína DcPSY1. Los números negros indican el inicio y final de la secuencia mientras que los números de colores indican en que aminoácidos empieza y termina cada dominio.

Habiendo terminado el análisis *in silico* de la secuencia del gen *DcPsy1* secuenciada, se procedió a realizar la recombinación tipo Gateway entre el vector PCR8 – PSY1 y el vector de destinación pEarlyGate101.

5.6.- Obtención del vector pEarlyGate101 - PSY1 para el ensayo de localización subcelular.

Para poder finalmente generar la construcción para expresar la proteína PSY1 fusionada a una proteína fluorescente, se procedió a recombinar el vector de entrada PCR8 – PSY1 con el vector pEarlyGate101 de la manera en la que se detalla en la sección 3.20 y obtener el vector pEarlyGate101 – PSY1. El vector pEarlyGate101 presenta el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (un promotor fuerte y constitutivo), otorga resistencia a kanamicina en bacterias y presenta la secuencia de la proteína YFP río abajo del sitio donde se inserte el gen de interés, lo que permite generar una proteína fusión entre el producto de dicho gen y la proteína YFP.

Se transformaron células de *E. coli* TOP10 quimiocompetentes con la mezcla de recombinación entre el vector pEarlyGate101 y PCR8-PSY1 siguiendo el protocolo detallado en la sección 3.14. Posteriormente, se realizó un PCR de colonia a 9 de los clones obtenidos siguiendo los pasos de la sección 3.15. Se utilizaron los partidores de *DcPsy1* para verificar la presencia de la construcción. Como control positivo se utilizó una alícuota del gen *DcPsy1* purificado y como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas. De este análisis, se obtuvo que 5 de los 9 clones tenían el plasmidio esperado (figura 16).

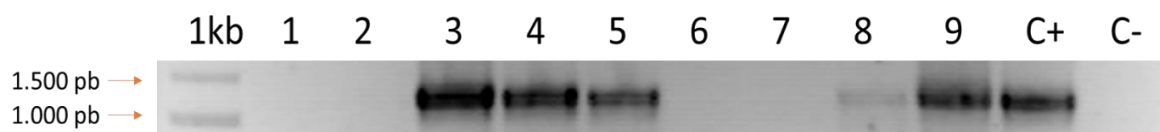


Figura 16.- Amplificación del ADNc del gen *DcPsy1* sin codón de *stop* de colonias de *E. coli* transformadas con el vector pEarlyGate101 – PSY1. Los carriles 1 al 9 corresponden a la reacción PCR de las colonias seleccionadas. En el control positivo (C+) se utilizó una alícuota del gen *DcPsy1* purificado de una banda de gel de agarosa. El control negativo (C-) corresponde a una reacción PCR sin material genético. El marcador de peso molecular (1kb) es el marcador GeneRuler™ 1kb DNA Ladder.

Posteriormente, se extrajo el ADNp de los 5 clones de *E. coli* transformadas con el vector pEarlyGate101 – PSY1 que arrojaron un resultado positivo en el PCR de colonia y se le realizó un análisis de restricción enzimática (sección 3.21) con la enzima *BcuI*, la cual corta el vector en una región interna y en el gen de interés, generándose dos bandas. Estas bandas varían su tamaño dependiendo de la orientación del inserto en el vector (Tabla XI).

Tabla XI.- Tamaños de fragmentos generados al realizar una digestión enzimática del vector pEarlyGate101 – PSY1 con la enzima *BcuI*.

Vector pEarlyGate101 – PSY1	Fragmento 1 (pb)	Fragmento 2 (pb)
Inserto en sentido	937	11.083
Inserto en antisentido	2.021	9.999

Como resultado del análisis enzimático, se obtuvo que el ADNp de las 5 colonias presentaban el inserto en dirección sentido (figura 17) tal como se esperaba. Se corrobora de esta manera la presencia del inserto y su correcta recombinación en el vector.

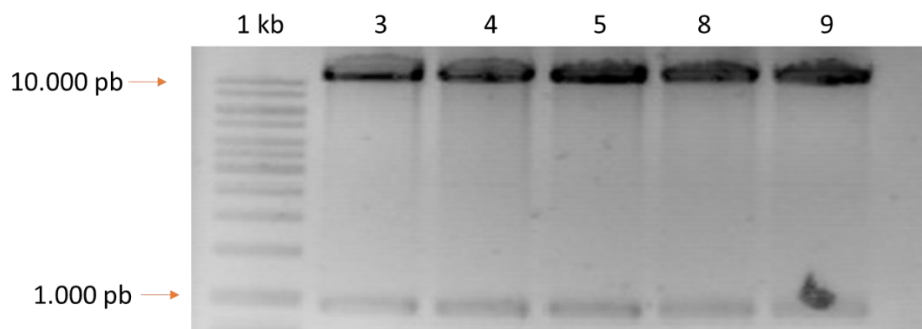


Figura 17.- Digestión enzimática con la enzima *BcuI* realizada al ADNp de colonias pEarlyGate101 – PSY1. Los carriles marcados con 3, 4, 5, 8 y 9 corresponden a las digestiones enzimáticas del ADNp de los clones seleccionados. El marcador de peso molecular (1kb) es el marcador GeneRuler™ 1kb DNA Ladder. Los fragmentos esperados obtenidos son de 937 y 11.083 pb.

Estos resultados permiten concluir que se logró generar el vector pEarlyGate101 – PSY1 (figura 18).

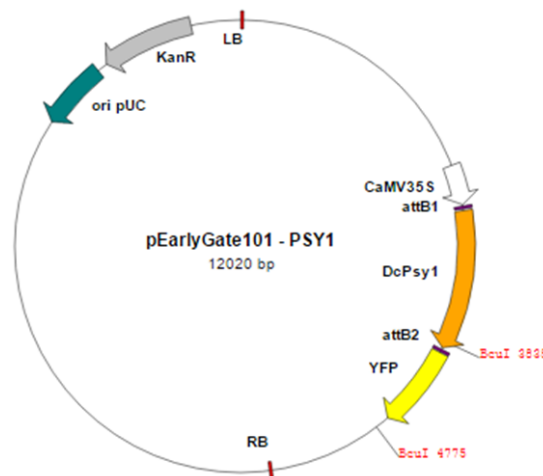


Figura 18.- Representación de vector generado al recombinar por tecnología Gateway el vector PCR8 – PSY1 con el de destino pEarlyGate101-PSY1. El vector cuenta con un gen que confiere resistencia a kanamicina en bacterias, un origen de replicación tipo pUC, los sitios RB y LB, el gen de interés, la secuencia para la proteína YFP y dos sitios de corte para la enzima *BcuI*, esta enzima reconoce una secuencia dentro del vector y una secuencia dentro del gen de interés. El gen de interés queda fusionado en su extremo C-terminal a YFP.

5.7.- Localización subcelular mediante transformación transiente de hojas de *Nicotiana tabacum* con *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 pEarlyGate101 – PSY1.

Se transformó *A. tumefaciens* quimiocompetente (sección 3.22) con el vector pEarlyGate101 – PSY1 con el fin de ser usadas en la transformación transitoria de hojas de una planta de *Nicotiana tabacum* para visualizar bajo microscopio la señal de la proteína fusión PSY1 – YFP. A 10 de las colonias de *A. tumefaciens* obtenidas se les realizó un PCR de colonia con el cual se verificó que todas ellas amplificaron el ADNc del gen *DcPsy1* (figura 19).

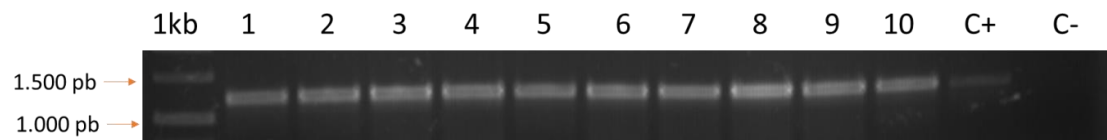


Figura 19.- **Amplificación del ADNc del gen *DcPsy1* sin codón de *stop* de colonias de *A. tumefaciens* transformadas con el vector pEarlyGate101 – PSY1.** Los carriles correspondientes a la reacción PCR de las colonias son los marcados con números del 1 al 10. En el control positivo (C+) se utilizó el vector pEarlyGate101 – PSY1. El control negativo (C-) corresponde a una reacción PCR sin material genético. El marcador de peso molecular (1kb) es el marcador GeneRuler™ 1kb DNA Ladder.

Posteriormente, se agroinfiltraron hojas de *N. tabacum* mediante *A. tumefaciens* GV3101 pEarlyGate101 – PSY1 de la forma en la que se detalla en la sección 3.23. Las muestras recolectadas se observaron bajo microscopio de epifluorescencia a los 4 días post infiltración (sección 3.24). En la figura 20 en los paneles A, B, C y D, se muestran los resultados de una misma sección de una hoja agroinfiltrada con el vector pEarlyGate101 – PSY1, mientras que E, F, G y H pertenecen a una hoja control negativo (sin inserto). Al usar el filtro Cy3 (figura 20.C y G), es posible apreciar un patrón puntuado de color rojo que corresponde a la autofluorescencia de la clorofila en los cloroplastos. Por otro lado, al usar el filtro FITC (figura 20.B y F), el cual permite observar la fluorescencia que emite la proteína YFP en las hojas infiltradas, el patrón puntuado sólo se puede apreciar en la hoja agroinfiltrada con el vector pEarlyGate101 – PSY1 (figura 20.B) y no en el control negativo (figura 20.F). Más aún, al realizar la superposición de las imágenes de la figura 20.B y la figura 20.C, se puede observar

que ambas señales colocalizan al apreciar la coloración amarilla que se produce por la superposición de la señal roja y verde. Al superponer las imágenes de la figura 20.F y 20.G sólo se logra observar el patrón punteado de la autofluorescencia de la clorofila. Este resultado demuestra que la proteína fusión PSY1 – YFP se encuentra localizada en los cloroplastos de la planta, lo que indicaría que la proteína PSY1 presenta un péptido señal que es reconocido por la maquinaria de celular y dirige a la proteína a plastidios.

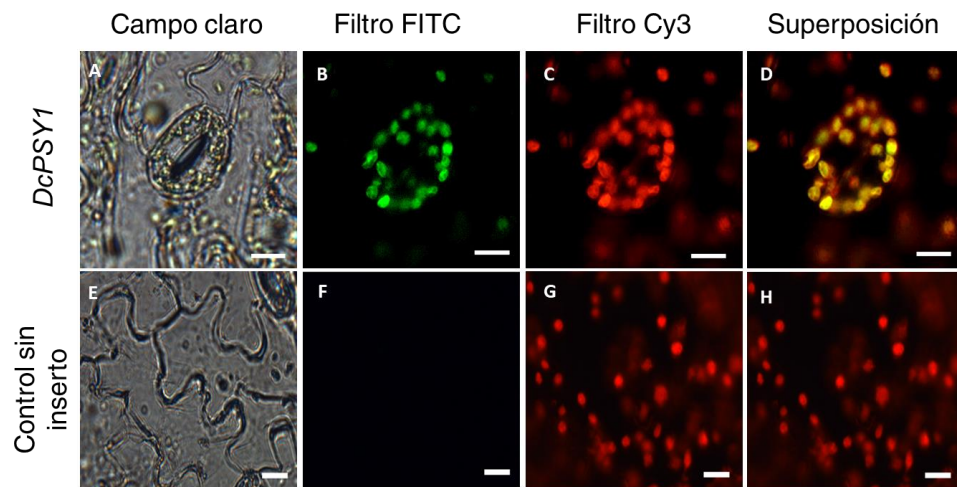


Figura 20.- Localización subcelular de la proteína de fusión DcPsy1:YFP en células epidermales de hojas de tabaco. A, B, C y D, corresponde a la microscopía de hojas de tabaco transformadas transitoriamente con la construcción pEarlyGate101 – PSY1. E, F, G y H, corresponden a la microscopía de hojas de tabaco infiltradas sin el inserto (control negativo). A y E, son fotografías de campo claro. C y G, son fotografías tomadas con el filtro Cy3, para visualizar la autofluorescencia de la clorofila. B y F, son fotografías tomadas con el filtro FITC, para observar la fluorescencia de YFP. D, corresponde a la superposición de las imágenes B y C. H, corresponde a la superposición de las imágenes F y G. Se utilizó un aumento de 200x. La barra de color blanco indica un tamaño de 15 μm .

Discusión

6.1.- Transformación estable de explantes de *Daucus carota*

Daucus carota presenta dos genes que codifican una enzima fitoeno sintasa, el gen *DcPsy1* y el gen *DcPsy2*. Se ha descrito que en otras especies vegetales que presentan más de un gen codificante de esta enzima fitoeno sintasa, estos tienen función órgano específica (Li y cols., 2008; Welsch y cols., 2008). En el caso de *D. carota*, en nuestro grupo de investigación hemos determinado que los genes *DcPsy1* y *DcPsy2* tienen una expresión diferencial durante el desarrollo de la planta (Fuentes y col., 2012), observando además que *DcPsy2* presenta en su región promotora elementos cis regulados por luz, fitohormonas y estrés (Fuentes, 2011). En plantas de *Nicotiana tabacum* transgénicas para estos genes, se observó un aumento en la cantidad de carotenoides totales en las plantas transgénicas *DcPsy1* y *DcPsy2* (Acevedo. 2011; Acevedo. 2013). Por lo tanto, con el fin de poder analizar en trabajos futuros si los genes *DcPsy1* y *DcPsy2* de *Daucus carota* tienen una función órgano específica en la propia planta, en este Seminario de Título se transformaron explantes de *Daucus carota* con vectores que permitieron la sobreexpresión de dichos genes.

Como resultado de la transformación, se obtuvieron los explantes mostrados en la figura 4. Estos explantes durante su regeneración *in vitro* demostraron notorias diferencias entre sí. La primera diferencia fue que todos los embriones de los explantes control (silvestres) (figura 4.I), tuvieron un desarrollo de dos semanas más rápido de los embriones en comparación a los embriones de los explantes transformados con los genes *DcPsy1* y *DcPsy2*. Esta diferencia, probablemente se atribuye a que los explantes transformados se cultivaron en medios suplementados con el antibiótico kanamicina, mientras que los explantes control se cultivaron en medios sin este antibiótico. Se ha descrito en literatura que el antibiótico kanamicina inhibe la embriogénesis y la proliferación celular en plantas como el algodón (Zhang. 2001). Los explantes transformados si bien tienen un gen de resistencia a kanamicina (introducido junto al gen de interés), estos aún debían combatir el estrés que el antibiótico provocaba, por lo cual no todos sus recursos y energía iban destinados al desarrollo de los embriones.

Uno de los cambios más notorios se observó a los 2 y 3 meses de cultivo *in vitro* (figura 4.G, H e I; 5.A, B y C), donde los explantes transformados con los genes *DcPsy1* y *DcPsy2* presentaron embriones de una tonalidad amarillo – anaranjada en comparación a los embriones provenientes de plantas control que tenían una coloración amarillo – verdosa. Esta diferencia en la coloración, se deben probablemente a la existencia de una mayor cantidad de carotenoides en los embriones provenientes de explantes transformados, producto de la expresión del transgen. Es importante recordar que estos genes codifican una proteína fitoenosintasa funcional (Acevedo 2011; Acevedo 2013), siendo la primera enzima de la ruta de síntesis de carotenoides (Cunningham y cols., 1998; Shewmaker y cols., 1999; Bramley 2002; Fraser y Bramley, 2004). La sobreexpresión de *Psy* en plantas es suficiente para inducir un aumento en la acumulación de carotenoides (Shewmaker y cols., 1999; Lindgren y cols., 2003). Es interesante destacar que la expresión de *Psy* de *A. thaliana* en la variedad blanca de zanahoria fue suficiente para generar plantas transgénicas con raíces anaranjadas (Maass y cols., 2009) y que la expresión en la misma planta de *arabidopsis* generó brotes anaranjados al ser crecidos en oscuridad (Maass y cols., 2009). En el estadio de plántulas, incubadas bajo fotoperiodo (figura 5.D. E y F), se observó que el 21% de las plántulas *DcPsy1* y el 53% de las plántulas *DcPsy2*, presentaban los cotiledones e hipocótilos con una coloración anaranjada, en comparación a la coloración amarilla del hipocótilo y verdosa que el 100% de los cotiledones de los controles mostraba. Esto nuevamente se podría deber a una mayor acumulación de carotenoides y permite sugerir que la expresión de los transgenes es suficiente para inducir la ruta de síntesis de carotenoides en *D. carota* y permitir la acumulación de los pigmentos en raíces y la plántula completa aun cuando éste crece bajo fotoperiodo. Por otro lado, también se observó que las plántulas controles presentaron una tasa de crecimiento mayor en comparación a las que procedieron de explantes transformados, esto puede ser atribuido al hecho de que las plántulas controles seguían siendo cultivadas en medios sin antibiótico a diferencia de las plántulas *DcPsy1* y *DcPsy2* que se cultivaban en medios con kanamicina

En el caso de las plantas de 5 meses de cultivo *in vitro* bajo fotoperiodo (figura 5. G, H e I), el 5% de las plantas *DcPsy2* presentaron desarrollo y coloración anaranjada en la raíz modificada en crecimiento. El 17% de las plantas *DcPsy1*

mostraron un leve desarrollo de la raíz modificada, mientras que el 100% de las plantas control mostraron un nulo desarrollo en esa etapa. Este podría ser un primer indicio de alguna función órgano específica que estén ejerciendo los genes *DcPsy1* y *DcPsy2* en la raíz modificada de *Daucus carota*. Se ha descrito que la luz afecta negativamente el desarrollo de la raíz modificada y que bajo esta condición de crecimiento de la raíz en luz, no se sintetizan carotenoides en la raíz (Stange y cols., 2008 y Fuentes y cols., 2011). No obstante, este efecto obtenido en la raíz de las plantas *DcPsy1* y *DcPsy2* también es posible atribuirlo a el método de transformación por agrobacterium, ya que, los genes de interés se insertan de manera azarosa en el genoma de la planta y esto puede llegar a generar distintos fenotipos. Por otro lado, las plantas de 5 meses provenientes de los eventos de transformación que presentaron en etapas previas color anaranjado en sus cotiledones, perdieron la tonalidad anaranjada en hojas verdaderas. Esto posiblemente se debe a que en hojas el pigmento de clorofila se encuentra en mayor abundancia que los carotenoides, lo que puede enmascarar el color anaranjado.

Por último, después de 3 meses de cultivo en tierra, no se encontraron diferencias fenotípicas evidentes en la zona aérea de las plantas *DcPsy1*, *DcPsy2* y las plantas controles, en cuanto al tamaño y coloración. Esta observación no quiere decir que las plantas *DcPsy1* y *DcPsy2* no se encuentren produciendo en hojas una mayor cantidad de carotenoides que las plantas control, ya que el efecto puede estar siendo enmascarado por los pigmentos de clorofila. Por otro lado, no se buscaron diferencias entre las raíces de las plantas transformadas y las controles, porque sacar la raíz significa sacrificar a la planta, la cual aún se necesita para experimentos posteriores donde se evaluarán los niveles de carotenoides totales en hojas y raíz, así como los niveles de expresión de los genes *DcPsy1* y *DcPsy2* en comparación a los niveles en las plantas controles. Sin embargo, el fenotipo de color naranja de las plantas *DcPsy1* y *DcPsy2* que presentaron durante su cultivo *in vitro* sugiere fuertemente que se encuentran produciendo una mayor cantidad de carotenoides en comparación a las plantas controles.

En cuanto al análisis de la transgenie de las plantas provenientes de eventos de transformación, se obtuvo que 11 de las 17 líneas de plantas *DcPsy1* analizadas son transgénicas (figura 6), mientras que de las 7 líneas analizadas de plantas *DcPsy2*, las

7 eran líneas transgénicas (figura 7). Lo que permite decir que la tasa de éxito de transformación es entre un 64 y 100% y que con ello se logró obtener líneas transgénicas de plantas de *D. carota* con el gen *DcPsy1* y el gen *DcPsy2* para estudios posteriores.

6.2.- Análisis *in silico* de la secuencia del ADNc del gen *DcPsy1*

El segundo objetivo de este seminario de título consistió en la generación de un vector que permitiera la sobreexpresión de una proteína de fusión de DcPSY1:YFP para poder realizar ensayos de localización subcelular. Es importante determinar a nivel funcional la localización subcelular de la proteína DcPSY1 porque es necesaria una localización plastidial de esta enzima para poder interactuar con las otras enzimas carotenogénicas para la síntesis correcta de carotenoides.

El análisis de la secuencia del ADNc del gen *DcPsy1* linsertado en el vector pCR8/GW/TOPO (figura 12) indica que esta tiene 16 diferencias nucleotídicas en comparación a la descrita en literatura (código de acceso DQ192186 en NCBI). Esto generó la duda de si esas mutaciones fueron causadas durante el proceso de amplificación con la enzima *Pfu* polimerasa o si eran polimorfismos de nucleótidos simples (*SNP*). La enzima *Pfu* polimerasa presenta una tasa de error de $2,6 \times 10^{-6}$ nucleótidos por ciclo (Lundberg y col., 1991), lo que, si bien hizo que la posibilidad de que existiesen 16 errores fuese pequeña, la posibilidad existía. Se decidió analizar la secuencia de aminoácidos que traducía el gen *DcPsy1* secuenciado y se comparó con la secuencia de la proteína reportada en literatura (figura 13). El análisis de las secuencias proteicas indicó que sólo había 4 aminoácidos diferentes entre las secuencias, de entre los cuales dos eran cambios conservativos y ninguno se encontraba en los dominios predichos de la proteína

Se realizó un análisis *in silico* para determinar si los cambios de aminoácidos afectaban la funcionalidad del péptido señal de la proteína DcPSY1 (tabla VI) o si se encontraban dentro de un dominio funcional (figura 15). El análisis *in silico* indicó que los 4 cambios de aminoácidos se encontraban en la región del péptido señal y en la región N – terminal de la proteína, además de que estos cambios no modifican la señalización a plastidios que presenta la proteína *DcPsy1* y no forman parte de dominios conservados funcionales de la enzima. Estos estudios permiten afirmar que

se obtuvo efectivamente el ADNc sin codón de *stop* del gen *DcPsy1* y que las diferencias entre la secuencia clonada y la descrita en literatura pueden deberse a *SNPs* entre las diferentes variedades de zanahoria.

6.3.- Ensayo de localización subcelular de la proteína DcPSY1:YFP

Para poder cumplir con el objetivo específico 2, se transformó hojas de *N. tabacum* mediante *A. tumefaciens* con el vector propuesto pEarlyGate101-PSY1, para la sobreexpresión de la proteína fusión DcPSY1:YFP. Los resultados demuestran que efectivamente se logró generar un vector que expresa una proteína de fusión entre la proteína DcPSY1 y la proteína fluorescente YFP y que la proteína de fusión DcPSY1:YFP se encuentra localizada en cloroplastos de la planta, indicando que la proteína PSY1 presenta una localización subcelular en plastidios. Este resultado se correlaciona con lo descrito para la proteína DcPSY2, la cual también tiene una localización subcelular en plastidios (Peirano, 2013) y se condice con los resultados obtenidos en tabaco al expresar ambos genes (Acevedo, 2013).

Conclusión

Las principales conclusiones de este seminario de título son:

- Se obtuvieron 11 y 7 líneas transgénicas de plantas de *D. carota* transformadas con el gen *DcPsy1* y *DcPsy2*, respectivamente. Lo que equivale a un 64% y 100% de obtención de plantas transgénicas dentro de la población seleccionada.
- Al generar un vector que permite la expresión de una proteína fusión entre DcPSY1 y la proteína fluorescente YFP, se determinó que la proteína DcPSY1 presenta una localización subcelular en plastidios.

Por lo tanto, es posible decir que se lograron cumplir satisfactoriamente los objetivos propuestos en este Seminario de Título.

Referencias

- Acevedo O. (2011).** Estudio de la funcionalidad de los genes fitoeno sintasa (*DcPsy1* y *DcPsy2*) de *Daucus carota* en el modelo vegetal *Nicotiana tabacum*. Seminario de título para optar al título de Ing. en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Acevedo O. (2013).** Evaluación de la funcionalidad del gen fitoeno sintasa 2 (*DcPsy2*) de *Daucus carota* y su participación en la tolerancia al estrés salino en el modelo vegetal *Nicotiana tabacum*. Tesis para optar al grado de Magister. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Alós E, Rodrigo M.J, Zacarias L. (2016).** Manipulation of carotenoid content in plants to improve human health. *Subcellular Biochemistry* 79:311-343. In "Carotenoids in Nature: Biosynthesis, Regulation and Function". Claudia Stange Ed. Springer, Cham.
- Auldrige ME, McCarty DR, Klee HJ. (2006).** Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Current Opinion in Plant Biology* 9:315-321.
- Baranska M, Baranski R, Schulz H, Nothnagel T (2006).** Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. *Planta* 224:1028–1037
- Barrero JM, Rodriguez PL, Quesada V, Alabadi D, Blazquez MA, Boutin JP, Marion-Poll A, Ponce MR, Micol JL. (2008).** The *ABA1* gene and carotenoid biosynthesis are required for late skotomorphogenic growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* 31:227-234.
- Barry D. (2000).** "Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution". *Trends in cell Biology* 10:440 – 447.
- Bartley G, Scolnik P. (1993).** cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of *PSY2*, a second tomato gene encoding phytoene synthase. *Journal of Biological Chemistry* 268:25718-25721.
- Bartley G, Scolnik P. (1995).** Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell* 7:1027–1038.
- Bartley G, Viitanen P, Bacot K, Scolnik P. (1992).** A tomato gene expressed during fruit ripening encodes an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. *Journal of Biological Chemistry* 267:5036-5039.
- Black R, Morris S, Bryce J. (2003).** Where and why are 10 million children dying every year? *The Lancet* 361:2226-2234.
- Bollag W. (1996).** The retinoid revolution. Overview The Federation of American Societies for Experimental Biology *Journal* 10:938-939.
- Bonk M, Hoffmann B, Von Lintig J, Schledz M, Al-Babili S, Hobeika E, Kleinig H, Beyer P (1997)** Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes in vitro reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly. *European Journal of Biochemistry* 247:942-950.

- Botella-Pavia P, Besumbes O, Phillips MA, Carretero-Paulet L, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M. (2004).** Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *The Plant Journal* 40:188-199.
- Bramley PM. (2002).** Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *Journal of Experimental Botany* 53:2107-2113.
- Britton G. (1995).** Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 9 (15):1551-1558.
- Buckner B, Miguel PS, Janick-Buckner D, Bennetzen JL. (1996).** The *y1* gene of maize codes for phytoene synthase. *Genetics* 143:479-488.
- Busch M, Seuter A, Hain R. (2002).** Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology* 128: 439-453.
- Carvajal R. (2010).** Complementación funcional en un sistema heterólogo del gen fitoeno sintasa 1 (*psy1*), involucrado en la biosíntesis de carotenoids en *Daucus carota* (zanahoria). Seminario de título para optar al título de Bioquímico. Universidad Católica de Valparaíso.
- Chen w, Punja Z. (2002).** Transgenic herbicide- and disease-tolerant carrot (*Daucus carota* L.) plants obtained through Agrobacterium-mediated transformation. *Plant Cell Reports* 20(10):929-935.
- Clotault J, Peltier D, Berruyer R, Thomas M, Briard M, Geoffriau E. (2008).** Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *Journal of Experimental Botany* 59:3563-3573.
- Cunningham Jr F, Gantt E. (1998).** Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology* 49(1):557-583.
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR. (2010).** Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology* 61:651-679.
- Diretto G, Al-Babili S, Tavazza R, Papacchioli V, Beyer P, Giuliano G. (2007).** Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of a bacterial mini-pathway. *Public Library of Science One* 2(4):e350.
- Dogbo O, Laferrière A, d'Harlingue A, Camara B. (1988)** Carotenoid biosynthesis: Isolation and characterization of a bifunctional enzyme catalyzing the synthesis of phytoene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (19):7054-7058.
- Doyle JJ, Doyle JL. (1990).** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.
- Ducreux LJ, Morris WL, Hedley PE, Shepherd T, Davies HV, Millam S, Taylor MA. (2005).** Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of beta-carotene and lutein. *Journal of Experimental Botany* 56:81-89.

- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G. (1999).** ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science* 8(5):978-84.
- Fantini E, Falcone G, Frusciante S, Giliberto L, Giuliano G. (2013).** Dissection of tomato lycopene biosynthesis through virus-induced gene silencing. *Plant Physiology* 163:986–998.
- Fraser PD, Bramley PM. (2004).** The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research* 43:228-265.
- Fraser PD, Enfissi EM, Halket JM, Truesdale MR, Yu D, Gerrish C, Bramley PM. (2007).** Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism. *Plant Cell* 19:3194-3211.
- Fraser PD, Kiano JW, Truesdale MR, Schuch W, Bramley PM. (1999).** Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. *Plant Molecular Biology* 40:687-698.
- Fraser, PD, Truesdale, M. R., Bird, C. R., Schuch, W., & Bramley, PM (1994).** Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development (evidence for tissue-specific gene expression). *Plant Physiology* 105(1):405-413.
- Fuentes P. (2011).** Identificación y análisis estructural y funcional de los promotores de los genes carotenogénicos *psy2* y *lcyb1* de *Daucus carota*. Tesis para optar al grado de Magister. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Fuentes P, Pizarro L, Moreno JC, Handford M, Rodriguez-Concepcion M, Stange C. (2012).** Light-dependent changes in plastid differentiation influence carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant Molecular Biology* 79:47-59.
- Giorio G, Stigliani AL, D'Ambrosio C. (2007).** Agronomic performance and transcriptional analysis of carotenoid biosynthesis in fruits of transgenic HighCaro and control tomato lines under field conditions. *Transgenic Research* 16:15-28.
- Goodwin T. (2012).** *The Biochemistry of the Carotenoids: Volume I Plants*, vol 1. Springer Science & Business Media,
- Howitt CA, Pogson BJ (2006).** Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell & Environment* 29:435-445.
- Ikoma Y, Komatsu A, Kita M, Ogawa K, Omura M, Yano M, Moriguchi T. (2001).** Expression of a phytoene synthase gene and characteristic carotenoid accumulation during citrus fruit development. *Physiologia Plantarum* 111:232-238.
- Isaacson T, Ronen G, Zamir D, Hirschberg J. (2002).** Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants. *Plant Cell* 14:333-342.
- Just BJ, Santos CAF, Fonseca MEN, Boiteux LS, Oloizia BB, Simon PW. (2007).** Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-

characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping, *Theoretical and Applied Genetics* 114:693-704.

Karvouni Z, John I, Taylor JE, Watson CF, Turner AJ, Grierson D. (1995). Isolation and characterisation of a melon cDNA clone encoding phytoene synthase. *Plant Molecular Biology*. 27(6):1153-62.

Kato M, Ikoma Y, Matsumoto H, Sugiura M, Hyodo H, Yano M. (2004). Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiology* 134:824-837.

Latowski D, Kuczynska P, Strzalka K. (2011). Xanthophyll cycle—a mechanism protecting plants against oxidative stress. *Redox Report* 16(2):78-90.

Li F, Vallabhaneni R, Wurtzel ET. (2008). PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant Physiology* 146:1333-1345.

Lindgren LO, Stalberg KG, Hoglund AS. (2003). Seed-specific overexpression of an endogenous *Arabidopsis* phytoene synthase gene results in delayed germination and increased levels of carotenoids, chlorophyll, and abscisic acid. *Plant Physiology* 132:779-785.

Lu S, Li L. (2008). Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. *Journal of Integrative Plant Biology* 50:778-785.

Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108:1-6.

Maass D, Arango J, Wüst F, Beyer P, Welsch R. (2009). Carotenoid Crystal Formation in *Arabidopsis* and Carrot Roots Caused by Increased Phytoene Synthase Protein Levels. *Public Library of Science One* 4(7):e6373.

Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, Howells RM, Kennedy MJ, Vernon G, Wright SY, Hinchliffe E, Adams JL, Silverstone AL. (2005). Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature biotechnology* 23(4):482-487.

Peirano C. (2013). Diseño y análisis funcional de vectores que permitirán elevar el contenido de carotenoides en frutos Seminario de título para optar al título de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Facultad de ciencias, Universidad de Chile.

Rodriguez-Concepcion M, Boronat A. (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiology* 130:1079-1089.

Ruiz-Sola A, Rodriguez-Conceptción M. (2012). Carotenoid Biosynthesis in *Arabidopsis*: A Colorful Pathway. *The arabidopsis Book* 10:e0158.

- Sandmann G. (1994).** Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *European Journal of Biochemistry*. 223:7-24.
- Scolnik P, Bartley G. (1994).** Nucleotide sequence of an Arabidopsis cDNA for phytoene synthase. *Plant Physiology* 104:1471-1472.
- Shewmaker CK, Sheehy JA, Daley M, Colburn S, Ke DY. (1999).** Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant Journal* 20:401-412.
- Schledz M, al-Babili S, von Lintig J, Haubruck H, Rabbani S, Kleinig H, Beyer P. (1996).** Phytoene synthase from *Narcissus pseudonarcissus*: functional expression, galactolipid requirement, topological distribution in chromoplasts and induction during flowering. *Plant Journal* 10:781-792.
- Soll, J., & Schleiff, E. (2004).** Protein import into chloroplasts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(3):198-208.
- Stange C, Fuentes P, Handford M, Pizarro L. (2008).** *Daucus carota* as a novel model to evaluate the effect of light on carotenogenic gene expression. *Biological Research* 41:289-301.
- Welsch R, Maass D, Voegel T, Dellapenna D, Beyer P. (2007).** Transcription factor RAP2.2 and its interacting partner SINAT2: stable elements in the carotenogenesis of Arabidopsis leaves. *Plant Physiology* 145:1073-1085.
- Welsch R, Wust F, Bar C, Al-Babili S, Beyer P. (2008).** A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes. *Plant Physiology* 147:367-380.
- Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I. (2000).** Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287(5451):303-305.
- Zhang BH, Liu F, Liu ZH, Wang HM, Yao CB. (2001).** Effects of Kanamycin on tissue culture and somatic embryogenesis in cotton. *Plant Growth Regulation* 33:137-149.
- Zhang J, Tao N, Xu Q, Zhou W, Cao H, Xu J, Deng X. (2009).** Functional characterization of Citrus *PSY* gene in Hongkong kumquat (*Fortunella hindsii* Swingle). *Plant Cell Reports* 28:1737–1746.
- Zhu C, Yamamura S, Koiwa H, Nishihara M, Sandmann G. (2002).** cDNA cloning and expression of carotenogenic genes during flower development in *Gentiana lutea*. *Plant Molecular Biology* 48:277-285.
- Zhu C, Yamamura S, Nishihara M, Koiwa H, Sandmann G. (2003).** cDNAs for the synthesis of cyclic carotenoids in petals of *Gentiana lutea* and their regulation during flower development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1625:305-308.